

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE BIOLOGÍA

Programa de Doctorado en Biología Integrada
Departamento de Biología Vegetal y Ecología
TESIS DOCTORAL



**ESTUDIO DE ENZIMAS IMPLICADAS EN EL INTERCAMBIO DE
ACILOS Y LA SÍNTESIS DE GLICEROLÍPIDOS EN EL RETÍCULO
ENDOPLÁSMICO DE GIRASOL (*Helianthus annuus*)**

Doctorando:

Ana Mapelli Brahm

Tutor:

Dr. José Antonio Monreal Hermoso

Directores:

Dr. Joaquín J. Salas Liñán

Dra. Mónica Venegas Calerón

Trabajo presentado por la Licenciada

Ana Mapelli Brahm



Fdo. Ana Mapelli Brahm

V.ºB.º

El tutor:

Dr. José Antonio Monreal Hermoso

Profesor Titular de Universidad de Sevilla



Fdo. Dr. José Antonio Monreal Hermoso

Los directores

Dr. Joaquín J. Salas Liñán

Científico titular

Instituto de la Grasa (CSIC)



Fdo. Dr. Joaquín J. Salas Liñán.

Dra. Mónica Venegas Calerón

Científica titular

Instituto de la Grasa (CSIC)



Fdo. Dra. Mónica Venegas Calerón

Sevilla, 07 enero de 2020

A mi familia, en especial a mi hermana por su apoyo.

Este trabajo se ha realizado en el Grupo de Genética y Bioquímica de Lípidos de Semillas del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de Productos Vegetales del Instituto de la Grasa (CSIC), siendo financiado por el Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades dentro del proyecto AGL2011-23187, titulado CONTROL DE LA SÍNTESIS DE ACEITES ALTO-ESTEÁRICO EN GIRASOL. Desde aquí se agradece todo el apoyo y los medios proporcionados por la mencionada institución.



Durante la tesis doctoral, el doctorando ha llevado a cabo las siguientes actividades:

Estancia en el extranjero

- Universidad de Alberta (*University of Alberta*)

Departamento: *Department of Agricultural, Food and Nutritional Science*

Ciudad: Edmonton (Canadá)

Fecha: 01/08/2014-28/11/2014

Publicaciones en revistas

Artículo enviado:

- *Molecular and functional characterization of lysophosphatidylcholine:acyl-CoA acyltransferase genes from sunflower (Helianthus annuus L.)*

Artículo en preparación:

- *Sunflower (Helianthus annuus L.) phosphocholine:dicacylglycerol cholinephosphotransferase and its role in the synthesis of sunflower oil*

Comunicaciones a congresos

- Congreso: *7th European Symposium on Plant Lipids*

Título: *Phosphatidylcholine:diacylglycerol cholinephosphotransferase gene from sunflower (Helianthus annuus L.)*

Autores: Mapelli-Brahm, A., Salas, J.J., Martínez-Force, E., Garcés, R., Venegas-Calderón, M.

Participación: Póster

Lugar: Harpenden, Reino Unido

Fecha: 05/07/2015-08/07/2015

- Congreso: *13th Euro Fed Lipid Congress*

Título: *Triacylglycerols biosynthesis in sunflower seeds*

Autores: Venegas-Calcrón, M., Mapelli-Brahm, A., Payá-Milans, M., Fernández-García, J.D., Ruiz-López, N., Pérez-Hormaeche J., Salas, J.J., Garcés, R. and Martínez-Force, E.

Participación: Póster

Lugar: Florencia, Italia

Fecha: 27/09/2015-30/09/2015

- Congreso: *XIII Plant Molecular Biology Meeting*

Título: *Lysophosphatidylcholine acyltransferase genes from sunflower (Helianthus annuus L.)*

Autores: Mapelli-Brahm, A., Salas, J.J., Martínez-Force, E., Garcés, R., Venegas-Calcrón, M.

Participación: Póster

Lugar: Oviedo, España

Fecha: 22/06/2016-24/06/2016

Docencia

- Profesora del Máster en Ciencia y Tecnología en Aceites y Bebidas Fermentadas

Organismo: Universidad Pablo de Olavide

Asignatura: Caracterización de las Materias Grasas

Lugar: Sevilla, España

Fecha: Noviembre 2015

- Colaboración Docente en Proyecto de Investigación de Bachillerato Internacional

Organismo: IES Martínez Montañés-Instituto de la Grasa (CSIC)

Proyecto: Mutantes de levadura

Lugar: Sevilla, España

Fecha: 21/11/2016-22/01/2017

- Colaboración Docente en Proyecto de Investigación de Bachillerato Internacional

Organismo: IES Martínez Montañés-Instituto de la Grasa (CSIC)

Proyecto: Efecto bactericida de extractos vegetales

Lugar: Sevilla, España

Fecha: 13/11/2017-22/01/2018

Nota sobre el estilo

El ámbito en el que se enmarca esta tesis está basado en publicaciones técnicas en inglés que imponen su propia terminología, a menudo repleta de expresiones, contracciones y abreviaturas en ese idioma. En la redacción de la misma se ha tomado la decisión de mantener en español las contracciones admitidas por la RAE más reconocibles en lengua castellana como son, por ejemplo, ARN o ADN. Otras contracciones más específicas y restringidas al campo de trabajo se han mantenido en su forma en inglés, como es el caso de PCR, ACP o LPCAT ya que la creación de acrónimos en español está poco extendida y podría inducir a confusión. Las palabras y expresiones tomadas del inglés se escribieron en cursiva.

En cuanto a la notación numérica se adoptó el punto decimal en lugar de la coma. Esta notación es ya admitida por la RAE en textos científicos y permite mantener la homogeneidad con las publicaciones que se están escribiendo.

CONTENIDO

ÍNDICE GENERAL.....	I
ÍNDICE DE FIGURAS.....	IV
ÍNDICE DE TABLAS.....	V
ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS.....	VI

ÍNDICE GENERAL

I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. EL GIRASOL (<i>Helianthus annuus</i> L.).....	1
1.1.1. ASPECTOS GENERALES DE LA PLANTA DE GIRASOL.....	1
1.1.2. PRODUCCIÓN Y DISTRIBUCIÓN DEL CULTIVO.....	2
1.1.3. PRODUCTOS DERIVADOS DEL GIRASOL.....	3
1.2. LÍPIDOS.....	5
1.2.1. DEFINICIÓN, CLASIFICACIÓN Y FUNCIONES DE LOS LÍPIDOS.....	5
1.2.2. ÁCIDOS GRASOS.....	6
1.2.2.1. Definición, clasificación y funciones.....	6
1.2.2.2. Propiedades físico-químicas.....	7
1.2.2.3. Nomenclatura.....	8
1.2.2.4. Ácidos grasos en la naturaleza.....	9
1.2.3. GLICEROLÍPIDOS.....	10
1.2.4. GLICEROFOSFOLÍPIDOS.....	13
1.3. BIOSÍNTESIS DE LÍPIDOS EN PLANTAS.....	15
1.3.1. BIOSÍNTESIS DE ÁCIDOS GRASOS.....	15
1.3.2. BIOSÍNTESIS DE TRIACILGLICEROLES (TAG).....	18
1.3.2.1. Ruta de Kennedy.....	18
1.3.2.2. Biosíntesis de triacilglicerole (TAG) independiente de acil-CoA.....	19
1.3.3. MECANISMOS DE EDICIÓN DE ACILOS.....	22
1.4. LISOFOSFATIDILCOLINA ACILTRANSFERASA (LPCAT).....	23
1.5. FOSFATIDILCOLINA:DIACILGLICEROL COLINAFOSFOTRANSFERASA (PDCT).....	27
II. OBJETIVOS.....	31
2. OBJETIVOS.....	33
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	34

3.1. MATERIALES	36
3.1.1. MATERIAL BIOLÓGICO Y CONDICIONES DE CULTIVO	36
3.1.1.1. <i>Escherichia coli</i>	36
3.1.1.2. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	36
3.1.1.3. <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	38
3.1.1.4. Girasol (<i>Helianthus annuus</i> L.)	38
3.1.1.5. <i>Arabidopsis thaliana</i> L.....	39
3.1.2. OLIGONUCLEÓTIDOS	40
3.1.3. PLÁSMIDOS Y VECTORES DE EXPRESIÓN	40
3.1.4. MEDIOS DE CULTIVO, AGENTES DE SELECCIÓN, TAMPONES Y SOLUCIONES	43
3.1.4.1. Medios de cultivo y agentes de selección	44
3.1.4.2. Tampones y soluciones para biología molecular	47
3.1.4.3. Tampones y soluciones bioquímicas.....	48
3.2. MÉTODOS	49
3.2.1. MÉTODOS DE BIOLOGÍA MOLECULAR	49
3.2.1.1. Extracción de ácidos nucleicos	49
3.2.1.2. Cuantificación de ácidos nucleicos	50
3.2.1.3. Diseño de oligonucleótidos	51
3.2.1.4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	52
3.2.1.5. Separación y purificación de ácidos nucleicos.....	56
3.2.1.6. Tratamientos enzimáticos del ADN	57
3.2.1.7. Secuenciación del ADN	58
3.2.1.8. Transformación génica.....	59
3.2.1.9. Expresión heteróloga de proteínas recombinantes en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	62
3.2.1.10. Ensayo de complementación con liso-PAF.....	63
3.2.1.11. Ensayo de complementación con 5-FOA.....	64
3.2.1.12. Obtención de la fracción microsomal de levadura	64
3.2.1.13. Cuantificación de proteínas microsomales.....	64
3.2.1.14. Medidas de densidad óptica de cultivos (DO ₆₀₀).....	64
3.2.1.15. Análisis informático de secuencias de ADN y proteínas	65
3.2.2. MÉTODOS ANALÍTICOS Y BIOQUÍMICOS	66
3.2.2.1. Análisis de la composición de ácidos grasos de levadura	66
3.2.2.2. Extracción de acil-CoAs y formación de acil-eteno-CoA fluorescentes.....	68
3.2.2.3. Cromatografía en capa fina (TLC).....	68
3.2.2.4. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	69
3.2.2.5. Síntesis de reactivos	70
3.2.2.6. Cuantificación de la radiactividad.....	72
3.2.2.7. Determinación de actividades enzimáticas	72

3.2.2.8. Análisis de la composición de ácidos grasos de <i>A. thaliana</i>	74
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	75
4.1. CLONACIÓN Y CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE ENZIMAS LISOFOSFATIDILCOLINA ACILTRANSFERASAS DE GIRASOL.....	77
4.1.1. CLONACIÓN DE LAS SECUENCIAS COMPLETAS DE LOS GENES <i>HaLPCAT</i> EN VECTORES DE CLONACIÓN.....	77
4.1.2. CARACTERÍSTICAS DE LAS SECUENCIAS AMINOACÍDICAS DE LAS PROTEÍNAS <i>HaLPCAT</i>	79
4.1.3. MECANISMO ENZIMÁTICO PROPUESTO PARA LAS ENZIMAS <i>HaLPCAT</i>	84
4.1.4. ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE LAS PROTEÍNAS <i>HaLPCAT</i>	85
4.1.5. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE LOS GENES <i>HaLPCAT</i> EN SEMILLAS Y TEJIDOS VEGETATIVOS	86
4.1.6. SUBCLONACIÓN DE LAS SECUENCIAS COMPLETAS DE LOS GENES <i>HaLPCAT</i> EN VECTORES DE EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS.....	89
4.1.7. ENSAYO DE COMPLEMENTACIÓN CON LISO-PAF	90
4.1.8. ENSAYO DE COMPLEMENTACIÓN CON 5-FOA	91
4.1.9. EFECTO DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES <i>HaLPCAT</i> SOBRE LA COMPOSICIÓN DE LÍPIDOS EN LEVADURA	92
4.1.9.1. Efecto sobre la proporción y el contenido de distintas especies de glicerolípidos de levadura	92
4.1.9.2 Efecto sobre la composición de ácidos grasos de distintas especies de glicerolípidos de levadura	96
4.1.10. ANÁLISIS DEL CONJUNTO DE ACIL-CoAs.....	98
4.1.11. CARACTERIZACIÓN <i>IN VITRO</i> DE LAS ENZIMAS <i>HaLPCAT</i>	100
4.1.12. ESTUDIOS DE COMPLEMENTACIÓN DEL MUTANTE DE ARABIDOPSIS <i>Atlpcat1/Atlpcat2</i>	106
4.2. CLONACIÓN Y CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LA ENZIMA FOSFATIDILCOLINA:DIACILGLICEROL COLINA FOSFOTRANSFERASA DE GIRASOL	109
4.2.1. CLONACIÓN DE UN FRAGMENTO INTERNO DEL GEN <i>HaPDCT</i>	109
4.2.2. CLONACIÓN DE LA SECUENCIA COMPLETA DEL GEN <i>HaPDCT</i>	110
4.2.3. CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA AMINOACÍDICA DE LA PROTEÍNA <i>HaPDCT</i>	111
4.2.4. MECANISMO ENZIMÁTICO PROPUESTO PARA <i>HaPDCT</i>	114
4.2.5. ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE LAS PROTEÍNAS <i>HaPDCT</i>	115
4.2.6. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA DE <i>HaPDCT</i> EN SEMILLAS Y TEJIDOS VEGETATIVOS	117
4.2.7. SUBCLONACIÓN DE LA SECUENCIA COMPLETA DEL GEN <i>HaPDCT</i> EN VECTORES PARA SU EXPRESIÓN EN <i>S. cerevisiae</i>	118
4.2.8. EFECTO DE LA EXPRESIÓN DE <i>HaPDCT</i> SOBRE LA COMPOSICIÓN DE ÁCIDOS GRASOS EN LEVADURA	119
4.2.9. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE <i>HaPDCT</i>	120
4.2.10. ESTUDIO DE LA ESPECIFICIDAD DE SUSTRATO DE <i>HaPDCT</i>	122

V. CONCLUSIONES	124
5. CONCLUSIONES	125
VI. BIBLIOGRAFÍA	127
6. BIBLIOGRAFÍA	129
VII. ANEXOS	148
7. ANEXOS	I

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Parte aérea de la planta de girasol y secciones de la inflorescencia.....	1
Figura 2. Sección longitudinal de un akenio de girasol	1
Figura 3. Evolución de la producción de semillas de girasol a nivel mundial y en la UE	2
Figura 4. Contribución de los principales productores de semilla de girasol.....	3
Figura 5. Estructuras de distintos tipos de ácidos grasos	8
Figura 6. Ejemplos de distintos glicerolípidos.	12
Figura 7. Ejemplo de un glicerofosfolípido.....	14
Figura 8. Reacciones implicadas en la síntesis de ácidos grasos.	17
Figura 9. Esquema general de la ruta de Kennedy.	19
Figura 10. Reacción de acilación de diacilgliceroles por acción de la enzima PDAT.	21
Figura 11. Esquema del intercambio de acilos a través del ciclo de Lands.	23
Figura 12. Esquema del intercambio de acilos a través de la acción de la enzima LPCAT	24
Figura 13. Reacción de intercambio de grupos fosfocolinas por acción de la enzima PDCT.....	28
Figura 14. Mapa del plásmido de clonación pMBL-T.	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
Figura 15. Mapa del plásmido de clonación pSpark® II.....	41
Figura 16. Mapa del plásmido de clonación pJET1.2	42
Figura 17. Mapa del plásmido de expresión pYES2.....	42
Figura 18. Mapa de los plásmidos de expresión p423GPD y p416GPD.	43
Figura 19. Mapa del plásmido de expresión pBIN19.....	43
Figura 20. Conversión del ácido 5-fluoroorótico (5-FOA) en 5-fluorouracilo (5-FU) por acción de <i>URA3</i>	46
Figura 21. Molécula de 1- <i>O</i> -alquil-2-liso- <i>sn</i> -glicero-3-fosfocolina (liso-PAF).....	47
Figura 22. Esquema de las estructuras génicas de los genes <i>AtLPCAT</i> Y <i>HaLPCAT</i>	79
Figura 23. Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de proteínas LPCAT.....	81
Figura 24. Predicción de la localización subcelular de las proteínas <i>HaLPCAT</i>	82
Figura 25. Perfil de hidrofobicidad de las proteínas <i>HaLPCAT</i>	83
Figura 26. Dominios transmembrana de las enzimas <i>HaLPCAT</i>	84
Figura 27. Mecanismo de acción propuesto para las enzimas LPCAT.....	85
Figura 28. Árbol filogenético de las proteínas <i>HaLPCAT</i>	87
Figura 29. Perfil de expresión de genes <i>LPCAT</i> de girasol y <i>Arabidopsis</i>	88
Figura 30. Ensayo de complementación con liso-PAF.....	91
Figura 31. Ensayo de complementación con 5-FOA.	92
Figura 32. Contenido de TAG de los cultivos de levadura expresando los genes <i>HaLPCAT</i>	95

Figura 33. Estudios de la influencia del tiempo de reacción y la cantidad de proteína en la actividad <i>HaLPCAT1</i>	101
Figura 34. Estudios de la influencia del tiempo de reacción y la cantidad de proteína en la actividad <i>HaLPCAT3</i>	102
Figura 35. Actividad de las enzimas <i>HaLPCAT</i> en su reacción directa en función del sustrato acil-CoA.	103
Figura 36. Actividad de las enzimas <i>HaLPCAT</i> en su reacción inversa en función del sustrato PC.	105
Figura 37. Caracterización del doble mutante <i>Atlpcat1/Atlpcat2</i>	107
Figura 38. Esquema de las estructuras génicas de los genes <i>HaPDCT</i> y <i>AtROD</i>	111
Figura 39. Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de proteínas PDCT.	112
Figura 40. Perfil de hidrofobicidad y dominios de transmembrana de <i>HaPDCT</i>	113
Figura 41. Predicción de la localización subcelular de <i>HaPDCT</i>	114
Figura 42. Mecanismo enzimático propuesto para PDCT.	115
Figura 43. Árbol filogenético de las proteína <i>HaPDCT</i>	116
Figura 44. Perfil de expresión de los genes <i>PDCT</i> de girasol y <i>Arabidopsis</i>	118
Figura 45. Actividad de <i>HaPDCT</i> en función de la cantidad de proteína microsomal y del tiempo de reacción	121
Figura 46. Producción de TAG en función de la cantidad de proteína microsomal y tiempo de reacción durante el ensayo de la enzima <i>HaPDCT</i>	121
Figura 47. Especificidad por sustrato de <i>HaPDCT</i>	122

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición típica de ácidos grasos de diferentes aceites comerciales de girasol	4
Tabla 2. Nombres de los ácidos grasos más comunes en los lípidos de plantas	9
Tabla 3. Estirpes de <i>saccharomyces cerevisiae</i> empleadas en el presente trabajo.....	37
Tabla 4. Mezclas de aminoácidos y bases nitrogenadas	46
Tabla 5. Características de las proteínas <i>HaLPCAT</i>	79
Tabla 6. Proporción y contenido de especies de lípidos polares en la cepa de levadura Y02431 que expresa los genes <i>HaLPCAT</i> y/o <i>CsFAD2</i>	94
Tabla 7. Composición de ácidos grasos de la fracción TAG, PE y PC de la cepa de levadura Y02431 expresando los genes <i>HaLPCAT</i> y/o <i>CsFAD2</i>	97
Tabla 8. Composición del conjunto de acil-CoAs de la cepa de levadura Y02431 que expresa los genes <i>HaLPCAT</i> y/o <i>CsFAD2</i>	99
Tabla 9. Porcentajes de conversión de 18:1-CoA a 18:2-CoA en la cepa de levadura Y02431 que expresa heterológamente los genes <i>HaLPCAT</i> y/o <i>CsFAD2</i>	100
Tabla 10. Composición de ácidos grasos de las semillas de <i>Arabidopsis thaliana</i> de la línea Col-0 (WT), del mutante <i>Atlpcat1/Atlpcat2</i> y del mismo mutante transformado con los genes <i>HaLPCATs</i>	108
Tabla 11. Composición de ácidos grasos de la cepa de levadura Y02431 que expresa <i>HaPDCT</i> en presencia o ausencia de expresión de <i>CsFAD2</i>	119

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

UNIDADES

Abreviatura o acrónimo	Nombre completo
Ci	Curio
Da	Dalton
DDF	Día Después de la Floración
DDS	Día Después de la Siembra
DO ₆₀₀	Densidad Óptica a 600 nm
dpm	Desintegración Por Minuto
E	Einstein (1 mol de fotones)
g	Aceleración de la gravedad
kb	Kilobase de nucleótidos (1000 pb)
pb	Par de Bases de nucleótidos
p/p	Porcentaje Peso/Peso
p/v	Porcentaje Peso/Volumen
rpm	Revolución Por Minuto
U	Unidad enzimática
v/v	Porcentaje Volumen/Volumen
ϵ	Coefficiente de extinción molar

ALGORITMOS DE BÚSQUEDA

Algoritmo	Uso
<i>tblastn</i>	Ofrece secuencias de nucleótidos traducidos homólogos a una secuencia aminoacídica
<i>blastp</i>	Ofrece secuencias aminoacídicas homólogas a una secuencia aminoacídica
<i>blastx</i>	Ofrece secuencias aminoacídicas homólogas a una secuencia de nucleótidos traducida
<i>blastn</i>	Ofrece secuencias de nucleótidos homólogos a una secuencia nucleotídica

REACTIVOS Y MEDIOS

Abreviatura o acrónimo	Nombre completo
BCA	Ácido bicinconínico (<i>Bicinchoninic acid</i>)
BSA	Albúmina de suero bovino (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
CTAB	Bromuro de hexadeciltrimetilamonio (<i>Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide</i>)
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTT	Ditiotreitol
EDS	Estadio De la Semilla
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
5-FOA	Ácido 5-fluoroorótico (<i>5-Fluoroorotic acid</i>)
GTE	Tampón Glicerol-Tris-EDTA

IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
LB	Medio de <i>Luria Bertani</i>
L- α -GPC	L- α -glicerilfosforilcolina (<i>L-α-glycerylphosphorylcholine</i>)
Liso-PAF	1-O-alkil-2-liso- <i>sn</i> -glicero-3-fosfocolina (<i>lyso-platelet-activating factor</i>)
MOPS	Ácido 3-morfolino-4-il-propano-1-sulfónico
MS	Medio <i>Murashige-Skoog</i>
PEG	Polietilenglicol
SC	Medio mínimo o Medio sintético completo (<i>Synthetic Complete Medium</i>)
SC-his	Medio SC sin histidina
SC-ura	Medio SC sin uracilo
SC-ura-his	Medio SC sin uracilo ni histidina
SDS	Dodecilsulfato sódico (<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>)
SOB	Medio <i>Super Optimal Broth</i>
TAE	Tampón Tris-Acetato-EDTA
TE	Tampón Tris-HCl-EDTA
Tampón <i>plate</i>	Tampón acetato de litio para transformación de levaduras
Tris o Tris base	Tris(hidroximetil)aminometano o 2-Amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol
Tris-Acetato	Tris base con pH ajustado con acetato
Tris-HCl	Tris base con pH ajustado con HCl
X-Gal	5-Bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido
YPD	Medio rico (<i>Yeast Peptone Dextrose</i>)
YNB	Medio <i>Yeast Nitrogen Base</i>

OTRAS ABREVIATURAS

Abreviatura o acrónimo	Nombre completo
A	Adenina
AE	Actividad Específica
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
ADNg	ADN genómico
ANOVA	Análisis de la varianza (<i>Analysis of variance</i>)
AmpR	Gen de resistencia a la ampicilina
AOCS Lipid Library	Revista de la Sociedad Americana de Químicos del Aceite (<i>Journal of the American Oil Chemists' Society</i>)
ARALIP	Página web sobre el metabolismo de lípidos en Arabidopsis (<i>The Arabidopsis Acyl-Lipid Metabolism Website</i>)
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ATP	Adenosín-5'-trifosfato (<i>Adenosine-5'-triphosphate</i>)
BLAST	Programa informático de alineamiento de secuencias (<i>Basic Local Alignment Search Tools</i>)
C	Citosina
CAS	Colección Andaluza de Semillas
<i>CaMV35S</i>	Promotor constitutivo del virus del mosaico de la coliflor
CBS	Centro para el análisis de secuencias biológicas (<i>Center for Biological Sequence Analysis</i>)
CDD	Base de datos de dominios conservados (<i>Conserved Domain Database</i>)
CDP	Citidina difosfato

CDP-Colina	Citidina difosfato colina o citidinadifosfocolina
CDP-DAG	Citidina difosfato diacilglicerol
CDP-etanolamina	Citidina difosfato etanolamina o citidinadifosfoetanolamina
CL	Cardiolipina
Col-0	Ecotipo Columbia 0
CSIC	Consejo Superior de Investigaciones Científicas
Ct	Ciclo umbral
C-terminal	Carboxilo terminal
CoA	Coenzima A
CYCI	Terminador transcripcional del gen CYC1
DAG	Diacilglicerol
dATP	Desoxiadenosina trifosfato
dCTP	Desoxicitidina trifosfato
DGDG	Digalactosildiacilglicerol o 1,2-diacil-3-O-(α -D-galactosil1-6)- α -D-galactosil- <i>sn</i> -glicerol
dGTP	Desoxiguanosina trifosfato
DHAP	Dihidroxiacetona fosfato
dNTP	Desoxinucleótidos trifosfato
dTTP	Desoxitimidina trifosfato
EC	Clasificación numérica de las enzimas (<i>Enzyme Commission Number</i>)
EE. UU.	Estados Unidos
ELSD	Detector de luz difusa (<i>Evaporative Light Scattering Detector</i>)
EST	Marcador de secuencia expresada (<i>Expressed Sequence Tag</i>)
<i>et al.</i>	Y colaboradores (<i>Et alii</i>)
EUROSTAT	Oficina Europea de Estadística (<i>European Statistical Office</i>)
ExPASy	Portal de recursos bioinformáticos (<i>Expert Protein Analysis System</i>)
F	Oligonucleótido en sentido directo (<i>Forward</i>)
FAME	Éster metílico de ácido graso (<i>Fatty Acid Methyl Ester</i>)
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (<i>Food and Agriculture Organization</i>)
FID	Detector de ionización de llama (<i>Flame Ionization Detector</i>)
5-FU	5-Fluorouracilo
G	Guanina
<i>GALI</i>	Promotor de expresión inducible por galactosa de levaduras
GenBank	Base de datos de secuencias genéticas del NCBI
<i>GPD</i>	Promotor de expresión constitutivo de levaduras
G3P	<i>sn</i> -Glicerol-3-fosfato
HFA	Ácido graso hidroxilado (<i>Hydroxylated Fatty Acid</i>)
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
IES	Instituto de Enseñanza Secundaria
ILCNC	Comité Internacional de Clasificación y Nomenclatura de Lípidos (<i>International Lipids Classification and Nomenclature Committee</i>)
IUPAC	Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>)
KD	Escala de hidrofobicidad de Kyte y Doolittle
LIPID MAPS	Base de datos de estructuras y nomenclatura de lípidos (<i>LIPID Metabolites And Pathways Strategy</i>)
LPA	Ácido lisofosfatídico o 1-acil- <i>sn</i> -glicerol-3-fosfato o 2-acil- <i>sn</i> -glicerol-3-fosfato

LPC	Lisofosfatidilcolina o 1-acil- <i>sn</i> -glicerol-3-fosforilcolina o 2-acil- <i>sn</i> -glicerol-3-fosforilcolina
LPE	Lisofosfatidiletanolamina o 1-acil- <i>sn</i> -glicerol-3-fosforiletanolamina o 2-acil- <i>sn</i> -glicerol-3-fosforiletanolamina
LPG	Lisofosfatidilglicerol o 1-acil- <i>sn</i> -glicerol-3-fosforilglicerol o 2-acil- <i>sn</i> -glicerol-3-fosforilglicerol
LPI	Lisofosfatidilinositol o 1-acil- <i>sn</i> -glicerol-3-fosforilinositol o 2-acil- <i>sn</i> -glicerol-3-fosforilinositol
LPS	Lisofosfatidilserina o 1-acil- <i>sn</i> -glicerol-3-fosfo-L-serina o 2-acil- <i>sn</i> -glicerol-3-fosfo-L-serina
MAG	Monoacilglicerol
MCS	Sitio de clonación múltiple (<i>Multiple Cloning Site</i>)
MEGA6	Programa para el análisis evolutivo (<i>Molecular Evolutionary Genetics Analysis</i>)
MGDG	Monogalactosildiacilglicerol o 1,2-diacil-3- <i>O</i> - β -D-galactosil- <i>sn</i> -glicerol
MMLV	Virus de la leucemia murina de moloney (<i>Moloney Murine Leukemia Virus</i>)
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido reducida
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducida
NCBI	National Center for Biotechnology Information (<i>National Center for Biotechnology Information</i>)
nd	No Detectado
MUFA	Ácido graso monoinsaturado (<i>MonoUnsaturated Fatty Acid</i>)
ORF	Marco abierto de lectura (<i>Open Reading Frame</i>)
PA	Ácido fosfatídico o 1,2-diacil- <i>sn</i> -glicerol-3-fosfato
PC	Fosfatidilcolina o 1,2-diacil- <i>sn</i> -glicerol-3-fosforilcolina
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PE	Fosfatidiletanolamina o 1,2-diacil- <i>sn</i> -glicerol-3-fosforiletanolamina
PI	Fosfatidilinositol o 1,2-diacil- <i>sn</i> -glicerol-3-fosforilinositol
PS	Fosfatidilserina o 1,2-diacil- <i>sn</i> -glicerol-3-fosfo-L-serina
PUFA	Ácido graso poliinsaturado (<i>Polyunsaturated Fatty Acid</i>)
R	Oligonucleótido en sentido inverso (<i>Reverse</i>)
RACE	Amplificación rápida de los extremos del ADNc (<i>Rapid Amplification of cDNA Ends</i>)
RE	Retículo Endoplásmico
SFA	Ácido graso saturado (<i>Saturated Fatty Acid</i>)
SIB	Instituto Suizo de Bioinformática (<i>Swiss Institute of Bioinformatics</i>)
<i>sn</i> -	Posición estereoespecífica de acilos
SQDG	Sulfoquinovosildiacilglicerol
T	Timina
TAG	Triacilglicerol
TEA	Trietilamina o <i>N,N</i> -dietiletanoamina
THF	Tetrahidrofurano
TLC	Cromatografía en capa fina
T _m	Temperatura de hibridación
R _f	Valor del avance del compuesto dividido por el avance del disolvente (<i>Rate Factor</i>)
UE	Unión Europea
USDA	Departamento de Agricultura de EE. UU. (<i>United States Department of Agriculture</i>)
UTR	Región no traducida (<i>Untranslated región</i>)

VLCFA

Ácido graso de cadena muy larga (*Very Long Chain Fatty Acid*)

AMINOÁCIDOS

Nombre común	Abreviatura	Símbolo
Ácido Aspártico	Asp	D
Ácido glutámico	Glu	E
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Cisteína	Cys	C
Fenilalanina	Phe	F
Glicina	Gly	G
Glutamina	Gln	Q
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Tirosina	Try	Y
Treonina	Thr	T
Triptófano	Trp	W
Valina	Val	V

ORGANISMOS

Nombre científico	Abreviatura	Nombre común
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	<i>A. tumefaciens</i>	--
<i>Amborella trichopoda</i>	<i>A. trichopoda</i>	--
<i>Arabidopsis lyrata</i>	<i>A. lyrata</i>	--
<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>A. thaliana</i> (<i>At</i>)	--
<i>Brachypodium distachyon</i>	<i>B. distachyon</i>	--
<i>Brassica napus</i>	<i>B. napus</i> (<i>Bn</i>)	Colza
<i>Camelina sativa</i>	<i>C. sativa</i> (<i>Cs</i>)	--
<i>Capsella rubella</i>	<i>C. rubella</i>	--
<i>Carthamus tinctorius</i>	<i>C. tinctorius</i>	Cártamo
<i>Chlorella variabilis</i>	<i>C. variabilis</i>	--
<i>Cicer arietinum</i>	<i>C. arietinum</i>	Garbanzo
<i>Coccomyxa subellipsoidea</i>	<i>C. subellipsoidea</i>	--
<i>Cocos nucifera</i>	<i>C. nucifera</i>	Coco
<i>Coriandrum sativum</i>	<i>C. sativum</i>	Cilantro
<i>Crepis alpina</i>	<i>C. alpina</i>	--
<i>Crepis palaestina</i>	<i>C. palaestina</i>	--
<i>Cucumis sativus</i>	<i>C. sativus</i>	Pepino
<i>Elaeis guinensis</i>	<i>E. guinensis</i>	Palma
<i>Escherichia coli</i>	<i>E. coli</i> (<i>Ec</i>)	--
<i>Eutrema salsugineum</i>	<i>E. Salsugineu</i>	--
<i>Fragaria vesca</i>	<i>F. vesca</i>	Fresa salvaje
<i>Glycine max</i>	<i>G. max</i>	Soja

<i>Helianthus annuus</i>	<i>H. annuus (Ha)</i>	Girasol
<i>Hiptage benghalensis</i>	<i>H. benghalensis</i>	--
<i>Hordeum vulgare</i>	<i>H. vulgare</i>	Cebada
<i>Lesquerella fendleri</i>	<i>L. fendleri</i>	--
<i>Linum usitatissimum</i>	<i>L. usitatissimum (Lu)</i>	Lino
<i>Medicago truncatula</i>	<i>M. truncatula</i>	Carretón
<i>Momordica charantia</i>	<i>M. charantia</i>	Melón amargo
<i>Nicotiana benthamiana</i>	<i>N. benthamiana (Nb)</i>	--
<i>Oryza sativa</i>	<i>O. sativa (Os)</i>	Arroz
<i>Perilla frutescens</i>	<i>P. frutescens</i>	Albahaca japonesa o cóleo silvestre
<i>Physaria fendleri</i>	<i>P. fendleri</i>	--
<i>Physcomitrella patens</i>	<i>P. patens (Pp)</i>	--
<i>Picea sitchensis</i>	<i>P. sitchensis</i>	Píce de Sitka
<i>Populus trichocarpa</i>	<i>P. trichocarpa</i>	Álamo negro o Álamo balsamero
<i>Prunus persica</i>	<i>P. persica</i>	Melocotonero
<i>Ricinus communis</i>	<i>R. communis (Rc)</i>	Ricino
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>S. cerevisiae (Sc)</i>	--
<i>Setaria italica</i>	<i>S. italica</i>	Mijo, Moha o Panizo
<i>Solanum lycopersicum</i>	<i>S. lycopersicum (Sl)</i>	Tomate
<i>Solanum tuberosum</i>	<i>S. tuberosum</i>	Patata
<i>Sorghum bicolor</i>	<i>S. bicolor</i>	Sorgo o Zahína
<i>Theobroma cacao</i>	<i>T. cacao</i>	Cacao
<i>Vernicia fordii</i>	<i>V. fordii</i>	Árbol de tung
<i>Vitis vinifera</i>	<i>V. vinifera</i>	Vid
<i>Zea mays</i>	<i>Z. mays</i>	Maíz

ÁCIDOS GRASOS

Nombre común	Nombre sistemático	Abreviatura*
Cáprico	Decanoico	10:0
Láurico	Dodecanoico	12:0
Mirístico	Tetradecanoico	14:0
Palmítico	Hexadecanoico	16:0
Palmitoleico	<i>cis</i> -9-Hexadecenoico	16:1 ^{Δ9c} , 16:1
Palmitolinoleico	<i>cis,cis</i> -9,12-Hexadecadienoico	16:2 ^{Δ9c,12c}
Esteárico	Octadecanoico	18:0
Oleico	<i>cis</i> -9-Octadecenoico	18:1 ^{Δ9c} , 18:1
Elaídico	<i>trans</i> -9-Octadecenoico	18:1 ^{Δ9t}
<i>cis</i> -Vaccénico	<i>cis</i> -11- Octadecenoico	18:1 ^{Δ11c}
Ricinoleico	12-hidroxi-9- <i>cis</i> -octadecenoico	12-OH 18:1 ^{Δ9c}
Linoleico	<i>cis,cis</i> -9,12-Octadecadienoico	18:2 ^{Δ9c,12c} , 18:2
-	<i>cis,cis</i> -11,14-Octadecadienoico	18:2 ^{Δ11c,14c}
α-linolénico	<i>cis,cis,cis</i> -9,12,15-Octadecatrienoico	18:3 ^{Δ9c,12c,15c} , 18:3
γ-linolénico	<i>cis,cis,cis</i> -6,9,12-Octadecatrienoico	18:3 ^{Δ6c,9c,12c}
Araquídico	Eicosanoico	20:0
-	<i>cis</i> -11-Eicosenoico	20:1 ^{Δ11c}
-	<i>cis,cis</i> -11,14-Eicosadienoico	20:2 ^{Δ11c,14c}
-	<i>cis,cis,cis</i> -11,14,17-Eicosatrienoico	20:3 ^{Δ11c,14c,17c}
Araquidónico	<i>todo cis</i> -5,8,11,14-Eicosatetraenoico	20:4 ^{Δ5c,8c,11c,14c}
Eicosapentaenoico	<i>todo cis</i> -5,8,11,14,17-Eicosapentaenoico	20:5 ^{Δ5c,8c,11c,14c,17c}
Behénico	Docosanoico	22:0
Erúxico	<i>cis</i> -13-Docosenoico	22:1 ^{Δ13c}

Docosahexaenoico	<i>todo cis</i> -4,7,10,13,16,19- Docosahexaenoico	22:6 ^{Δ4c,7c,10c,13c,16c,19c}
Lignocérico	Tetracosanoico	24:0
Nervónico	<i>cis</i> -15-Tetracosenoico	24:1 ^{Δ15c}

*Si no se indican las posiciones de las insaturaciones, 18:1, 18:2 y 18:3 hacen referencia a 18:1^{Δ9c} (oleico), 18:2^{Δ9c,12c} (linoleico) y 18:3^{Δ9c,12c,15c} (α -linolénico), respectivamente.

ACIL-CoAs

Nombre	Abreviatura*
Palmitil-CoA	16:0-CoA
Heptadecanoil-CoA	17:0-CoA
Palmitoleil-CoA	16:1 ^{Δ9c} -CoA
Estearil-CoA	18:0-CoA
Oleil-CoA	18:1 ^{Δ9c} -CoA
<i>cis</i> -Vaccenil-CoA	18:1 ^{Δ11c} -CoA
Ricinoleil-CoA	12-OH 18:1 ^{Δ9c} -CoA
Linoleil-CoA	18:2 ^{Δ9c,12c} -CoA
Araquidonil-CoA	20:4 ^{Δ5c,8c,11c,14c} -CoA
α -linolenil-CoA	18:3 ^{Δ9c,12c,15c} -CoA

* Si no se indican las posiciones de las insaturaciones en 18:1, 18:2 y 18:3 hacen referencia a 18:1^{Δ9c} (oleico), 18:2^{Δ9c,12c} (linoleico) y 18:3^{Δ9c,12c,15c} (α -linolénico), respectivamente.

FOSFATIDILCOLINAS / LISOFOSFATIDILCOLINAS

Nombre	Abreviatura*
<i>sn</i> -1-oleil- <i>sn</i> -2-oleil-fosfatidilcolina	<i>sn</i> -1-18:1 ^{Δ9c} - <i>sn</i> -2-18:1 ^{Δ9c} -PC (PC18:1/18:1)
<i>sn</i> -1-oleil- <i>sn</i> -2-linoleil-fosfatidilcolina	<i>sn</i> -1-18:1 ^{Δ9c} - <i>sn</i> -2-18:2 ^{Δ9c,12c} -PC (PC18:1/18:2)
<i>sn</i> -1-oleil- <i>sn</i> -2-linolenil-fosfatidilcolina	<i>sn</i> -1-18:1 ^{Δ9c} - <i>sn</i> -2-18:3 ^{Δ9c,12c,15c} -PC (PC18:1/18:3)
<i>sn</i> -1-palmitil- <i>sn</i> -2-ricinoleil-fosfatidilcolina	<i>sn</i> -1-16:0 ^{Δ9c} - <i>sn</i> -2-12-OH 18:1 ^{Δ9c} -PC (PC16:0/12-OH 18:1 ^{Δ9c})
<i>sn</i> -1-palmitil- <i>sn</i> -2-oleil- fosfatidilcolina	<i>sn</i> -1-16:0 ^{Δ9c} - <i>sn</i> -2-18:1 ^{Δ9c} -PC (PC16:0/18:1 ^{Δ9c})
<i>sn</i> -1-ricinoleil- <i>sn</i> -2-ricinoleil- fosfatidilcolina	<i>sn</i> -1-12-OH 18:1 ^{Δ9c} - <i>sn</i> -2-12-OH 18:1 ^{Δ9c} -PC (PC16:0/12-OH 18:1 ^{Δ9c})
<i>sn</i> -1-oleil-lisofosfatidilcolina	<i>sn</i> -1-18:1 ^{Δ9c} -LPC

*Si no se indican las posiciones de las insaturaciones en 18:1, 18:2 y 18:3 hacen referencia a 18:1^{Δ9c} (oleico), 18:2^{Δ9c,12c} (linoleico) y 18:3^{Δ9c,12c,15c} (α -linolénico), respectivamente.

TRIACILGLICEROS / DIACILGLICEROS

Nombre	Abreviatura*
<i>sn</i> -1-oleil- <i>sn</i> -2-oleil- <i>sn</i> -3-oleil-glicerol (trioleína)	<i>sn</i> -1-18:1 ^{Δ9c} - <i>sn</i> -2-18:1 ^{Δ9c} - <i>sn</i> -3-18:1 ^{Δ9c} -TAG <i>sn</i> -1,2,3-18:1 ^{Δ9c} -TAG o OOO
<i>sn</i> -1-linoleil- <i>sn</i> -2- oleil- <i>sn</i> -3- linoleil-glicerol	<i>sn</i> -1-18:2 ^{Δ9c,12c} - <i>sn</i> -2-18:1 ^{Δ9c} - <i>sn</i> -3-18:2 ^{Δ9c,12c} -TAG o <i>sn</i> -1,3-18:2 ^{Δ9c,12c} - <i>sn</i> -2-18:1 ^{Δ9c} -TAG o LOL
<i>sn</i> -1-linoleil- <i>sn</i> -2- linoleil- <i>sn</i> -3- oleil-glicerol	<i>sn</i> -1-18:2 ^{Δ9c,12c} - <i>sn</i> -2-18:2 ^{Δ9c,12c} - <i>sn</i> -3-18:1 ^{Δ9c} -TAG o <i>sn</i> -1,2-18:2 ^{Δ9c,12c} - <i>sn</i> -3-18:1 ^{Δ9c} -TAG o LLO
<i>sn</i> -1-linoleil- <i>sn</i> -2- linoleil- <i>sn</i> -3- linoleil-glicerol (trilinoleína)	<i>sn</i> -1-18:2 ^{Δ9c,12c} - <i>sn</i> -2-18:2 ^{Δ9c,12c} - <i>sn</i> -3-18:2 ^{Δ9c,12c} -TAG o <i>sn</i> -1,2,3-18:2 ^{Δ9c,12c} -TAG o LLL
<i>sn</i> -1-oleil- <i>sn</i> -2-oleil-glicerol (<i>sn</i> -1,2-dioleína)	<i>sn</i> -1-18:1 ^{Δ9c} - <i>sn</i> -2-18:1 ^{Δ9c} -DAG, <i>sn</i> -1,2-18:1 ^{Δ9c} -DAG o DO
<i>sn</i> -1-linoleil- <i>sn</i> -2-linoleil-glicerol (<i>sn</i> -1,2-dilinoleína)	<i>sn</i> -1-18:2 ^{Δ9c,12c} - <i>sn</i> -2-18:2 ^{Δ9c,12c} -DAG <i>sn</i> -1,2-18:2 ^{Δ9c,12c} -DAG o DL

*Si no se indican las posiciones de las insaturaciones en 18:1, 18:2 y 18:3 hacen referencia a 18:1^{Δ9c} (oleico), 18:2^{Δ9c,12c} (linoleico).

GENES, ENZIMAS Y FAMILIAS PROTEÍCAS

Abreviatura	Nombre completo
ACBP	Proteína de unión a acil-CoA
ACCase	Acetil-CoA carboxilasa
ACT	Gen actina
AGPAT	1-acilglicerol-3-fosfato- <i>O</i> -aciltransferasa (familia)
BC	Biotina carboxilasa
BCCP	Proteína transportadora de biotina y carboxilo
BE-PSS	(<i>Base-Exchange-type PS Synthase</i>)
CD-PSS	(<i>CDP-diacylglycerol-dependent PS Synthase</i>)
CT	Carboxiltransferasa
DAG-CPT	CDP-colina:diacilglicerol colinafosfotransferasa
DAG-EPT	CDP-etanolamina:diacilglicerol etanolaminafosfotransferasa
DGAT	Acil-CoA:diacilglicerol aciltransferasa
DGK	Diacilglicerol quinasa
ENR	Enoil-ACP reductasa
FADs	(<i>Fatty Acid Desaturases</i>)
FAD2	Oleato desaturasa
FAD3	Linoleato desaturasa
FAH12	Oleil hidroxilasa
FAS	Sintasa de ácidos grasos <i>Fatty Acid Synthase</i>
FAT-A	Acil-ACP tioesterasas plastidiales de ácidos grasos insaturados
FAT-B	Acil-ACP tioesterasas plastidiales de ácidos grasos saturados
GPAT	Glicerol-3-fosfato aciltransferasa
GPCAT	Glicerofosfocolina aciltransferasa

HAAD	β -Hidroxiacil-ACP deshidratasa
KAR	β -Cetoacil-ACP reductasa
KAS	β -Cetoacil-ACP sintasa
LACS	Acil-CoA sintetasa de ácidos grasos de cadena larga
LPAAT	Lisofosfatidato aciltransferasa
LPCAT	Lisofosfatidilcolina aciltransferasa
LPCT	Lisofosfatidilcolina transacilasa
LPEAT	Lisofosfatidiletanolamina aciltransferasa
LPGAT	Lisofosfatidilglicerol aciltransferasa
LPLATs	Lisofosfolípido aciltransferasas
LPT	Fosfatasa/fosfotransferasa de lípidos (<i>lipid phosphatase/phosphotransferase</i>) (familia)
MBOAT	O-Aciltransferasas de unión a membrana (familia)
MCAT	Malonil-CoA:ACP transacilasa
NADH	Desaturasas de ácidos grasos dependientes de nicotinamida adenina dinucleótido reducida
PAP	Fosfatidato fosfatasa
PDAT	Fosfolípido:diacilglicerol aciltransferasa
PDCT	Fosfatidilcolina:diacilglicerol colinafosfotransferasa
PLA2	Fosfolipasa A2
PLC	Fosfolipasa C
PLD	Fosfolipasa D
ROD1	Gen que codifica para PDCT en <i>Arabidopsis thaliana</i> (<i>Reduced Oleate Desaturation 1</i>)
SAD	Estearil-ACP desaturasa
SLC1	Gen que codifica para LPAAT en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SMS	Fosfatidil:ceramida colinafosfotransferasa
TSAP	Fosfatasa alcalina termosensible
URA3	Gen de síntesis de uracilo que codifica la orotidina-5'-fosfato descarboxilasa
YOR175c, LCA1, SCL4, LPT1 o ALE1	Gen que codifica para LPCAT en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
HIS3	Gen de síntesis de histidina

I. INTRODUCCIÓN

1.1. EL GIRASOL (*Helianthus annuus* L.)

1.1.1. ASPECTOS GENERALES DE LA PLANTA DE GIRASOL

El girasol (*Helianthus annuus* L.) es una planta anual dicotiledónea perteneciente a la familia *Asteraceae* (compuestas). Su inflorescencia, denominada capítulo, está formada por dos tipos de flores, las liguladas, que se encuentran en el perímetro del capítulo dispuestas radialmente en una o dos filas, y las tubulosas, que se encuentran en el centro del capítulo distribuidas en espiral (Figura 1). Las flores liguladas son estériles y las flores tubulosas son hermafroditas y al fecundarse dan lugar a los frutos.

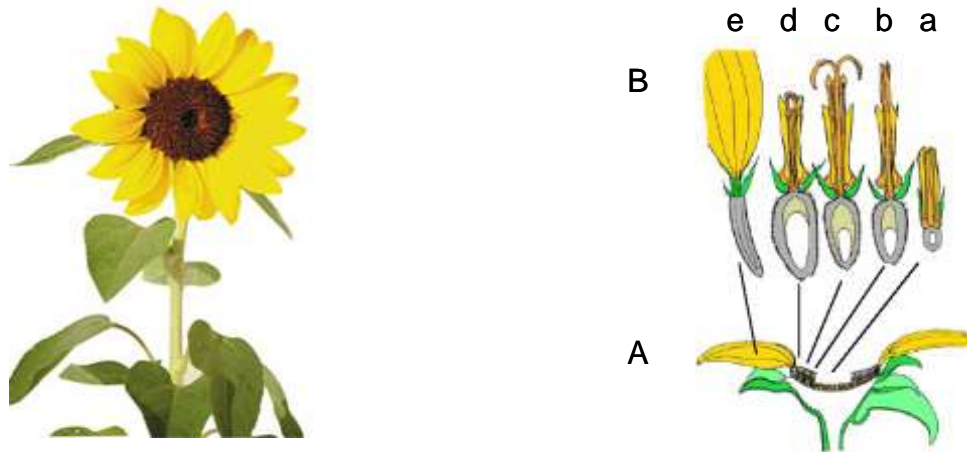


Figura 1. Parte aérea de la planta de girasol (izquierda) y secciones de la inflorescencia (derecha). A) Sección longitudinal del capítulo de girasol; B) Flores liguladas (e) y tubulosas en diferentes estadios de desarrollo: antes de abrirse (a); abriéndose (emergencia de estambres) (b); abierta (c) y después de fecundadas (d) (Alba y Llanos, 1990).

El fruto del girasol, denominado aquenio, está formado por un embrión (semilla) cubierto por un tegumento seminal y por una envuelta exterior dura y fibrosa (pericarpio). En el embrión se encuentran dos cotiledones, que constituyen la reserva energética de la semilla (Figura 2). La semilla de girasol representa aproximadamente el 80% del total del fruto y es rica en aceite, con un contenido de alrededor del 50% (p/p) (Autino et al., 1993; Bockisch, 1998).

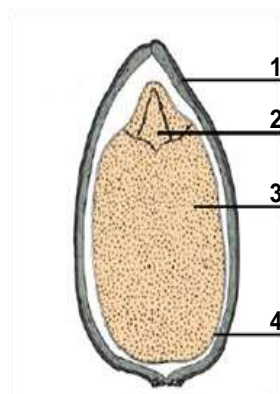


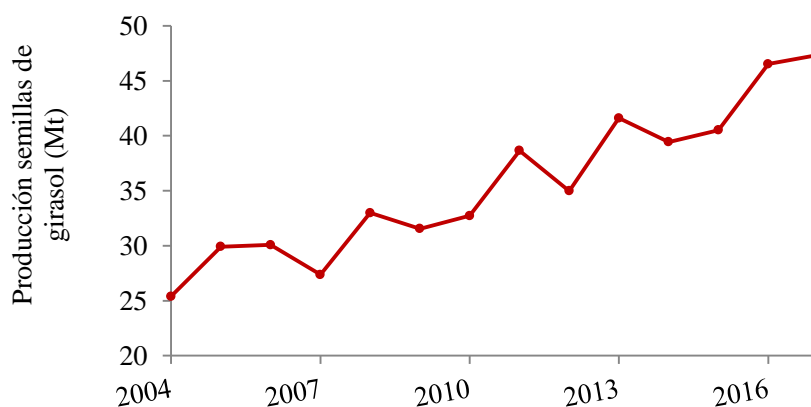
Figura 2. Sección longitudinal de un aquenio de girasol: 1. Pericarpio; 2. Gémula; 3. Cotiledón; 4. Membrana seminal (Vrânceanu, 1997).

1.1.2. PRODUCCIÓN Y DISTRIBUCIÓN DEL CULTIVO

El girasol supone el tercer cultivo oleaginoso más importante a nivel mundial tras la soja y la colza, con una producción media en los últimos 5 años de 40.6 millones de toneladas (Departamento de Agricultura de EE. UU., USDA, 2017). En la Unión Europea (UE) el girasol es el segundo cultivo oleaginoso más producido tras la colza, con una producción media en los últimos 5 años de 8.6 millones de toneladas (Oficina Europea de Estadística, EUROSTAT, 2017).

La producción de este cultivo ha ido creciendo durante los últimos años, tanto a nivel mundial como en la UE (Figura 3, EUROSTAT, 2017; USDA, 2017). Debido en parte al aumento del consumo general y de la demanda por parte de países emergentes, se prevé que este crecimiento continúe, estimándose una producción de hasta 60 millones de toneladas para el 2050 (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, FAO, 2017).

A



B

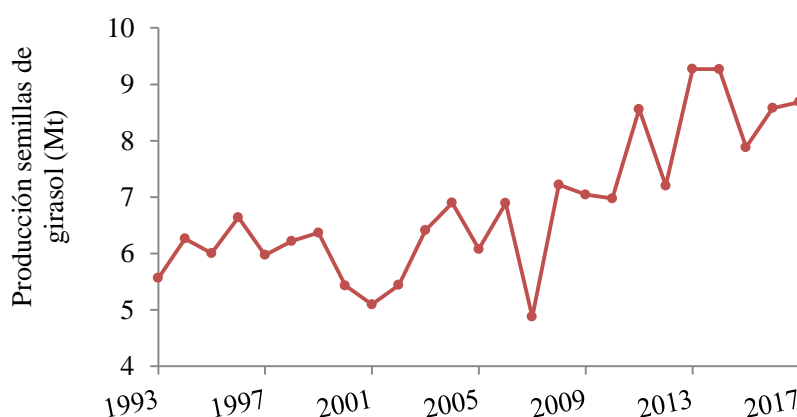


Figura 3. Evolución de la producción de semillas de girasol a nivel mundial (A; USDA, 2017) y en la UE (B; EUROSTAT, 2017) en los últimos años.

En el periodo 2016-2017 los principales productores mundiales de girasol fueron Ucrania y Rusia, que en conjunto proporcionaron más del 50% de la producción mundial. El tercer productor fue la UE que, con una producción próxima a 8.6 millones de toneladas, tuvo una contribución a la misma de algo más del 18% (Figura 4, USDA, 2017). En España se produjeron en este periodo cerca de 0.8 millones de toneladas de semilla de girasol (EUROSTAT, 2017).

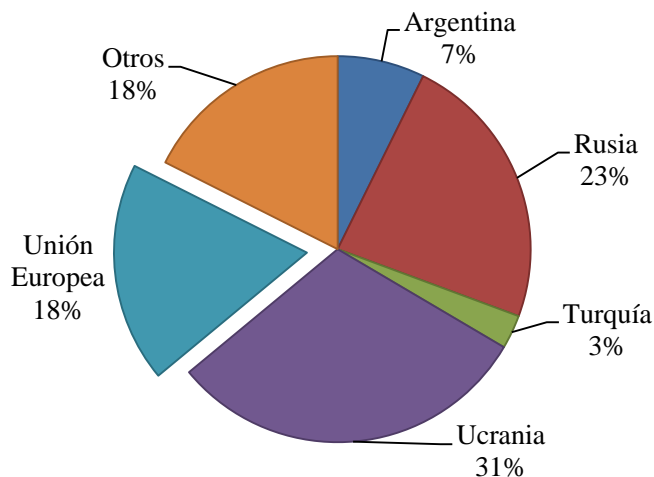


Figura 4. Contribución de los principales productores de semilla de girasol a la producción mundial en el periodo 2016-2017 (USDA, 2017).

Aunque la producción ha ido en aumento, desde el 2013 el área utilizada para el cultivo de girasol ha disminuido tanto en la UE como en España (EUROSTAT, 2017), lo que implicó un aumento en el rendimiento. La media de superficie cultivada para la producción de semillas de girasol en los últimos 5 años en la UE ha sido de 4.3 millones de hectáreas, siendo así el segundo cultivo en extensión tras la colza (EUROSTAT, 2017).

Con respecto a su aceite, el de girasol es el cuarto aceite vegetal más producido a nivel mundial tan sólo superado por el aceite de palma, soja y colza (USDA, 2017) y en la UE este aceite es el segundo más producido tras el de colza (Comisión Europea, 2017). Actualmente, los mayores productores de aceite de girasol son Ucrania, Rusia, la UE, Argentina y Turquía (USDA, 2017), con contribuciones a la producción mundial parecidas a la que tienen en producción de semilla (Figura 4).

El éxito que ha tenido este cultivo y su extensión a nivel mundial se deben a las numerosas ventajas que presenta. Entre ellas, el alto porcentaje en aceite de su semilla, de alrededor del 50% (p/p) (Autino et al., 1993; Bockisch, 1998), y su rápido crecimiento, características que en conjunto permiten la obtención de grandes cantidades de aceite por unidad de superficie y de tiempo. Además, se trata de una planta de fácil cultivo y con buena adaptación a una gran variedad de suelos. También hay que destacar que su aceite, de alta calidad desde el punto de vista nutritivo, presenta buena estabilidad de almacenaje (Vrânceanu, 1977) y bajos costes de extracción en comparación con los de otros aceites.

1.1.3. PRODUCTOS DERIVADOS DEL GIRASOL

La torta de girasol, obtenida como subproducto de la extracción del aceite, se emplea en la producción de harina, que se caracteriza por un alto contenido en proteínas (20-60%) y se usa principalmente para alimentación animal (Pedroche, 2015). Además, las semillas de girasol tostadas y saladas son un alimento popular en algunos países y también sirven como alimentación para roedores y aves.

El producto más importante derivado del girasol es sin duda su aceite, usado sobre todo para alimentación tanto a escala doméstica o de hostelería como a escala industrial. Se emplea principalmente como aceite de fritura pero también son notables sus aplicaciones como componente en la elaboración de salsas, emulsiones y margarinas, así como ingrediente común en ensaladas y recetas de cocina.

El aceite de girasol común es rico en ácido linoleico ($18:2^{\Delta 9c,12c}$), el cual supone del 48 al 74% del total de los ácidos grasos, seguido del ácido oleico ($18:1^{\Delta 9c}$). Este aceite presenta un bajo contenido en ácidos grasos saturados, principalmente palmítico ($16:0$) y esteárico ($18:0$). También hay que destacar la presencia en pequeñas cantidades, de algunos ácidos grasos saturados de cadena muy larga, como el ácido araquídico ($20:0$) y ácido behénico ($22:0$) (Tabla 1; Salas et al., 2015). El ácido α -linolénico ($18:3^{\Delta 9c,12c,15c}$) se encuentra en cantidades muy bajas.

Al igual que ocurre con otros cultivos de semillas oleaginosas, la temperatura a la que crece el cultivo afecta a la composición de ácidos grasos, principalmente a la proporción de ácido oleico y linoleico. Este efecto se ha observado no solo en las líneas estándares de girasol sino también en algunas líneas mutantes, como el girasol alto oleico (Fernández-Moya et al., 2002; Garcés et al., 1989; Martínez-Force et al., 1998; Harris et al., 1978).

En los aceites vegetales, como el de girasol, los ácidos grasos se encuentran mayoritariamente formando parte de triacilgliceroles (TAG). Estos dan cuenta de alrededor del 95% del aceite, mientras que los ácidos grasos libres tan sólo suponen un 0.5% del mismo (Campbell, 1983). Los TAG más abundantes de este aceite son la trilinoleína (LLL) y las oleil-dilinoleínas (*sn*-1,2-dilinoleil-*sn*-3-oleil-glicerol, LLO y *sn*-1,3-dilinoleil-*sn*-2-oleil-glicerol, LOL), mientras que la trioleína (OOO) se encuentra en una proporción menor (Salas et al., 2015).

Tabla 1. Composición típica de ácidos grasos de diferentes aceites comerciales de girasol.

	Mol (%)						
	16:0	16:1 ^{Δ9c}	18:0	18:1 ^{Δ9c}	18:2 ^{Δ9c,12c}	20:0	22:0
Girasol común	6.3	0.1	4.6	26.7	61.1	0.3	0.9
Alto oleico	3.8	-	4.1	82.1	8.7	0.4	0.9
Medio oleico	4.9	-	3.8	57.9	32.3	0.3	0.8

Adaptado de Salas et al., 2015. 16:0, ácido palmítico; 16:1^{Δ9c}, ácido palmitoleico; 18:0, ácido esteárico; 18:1^{Δ9c}, ácido oleico; 18:2^{Δ9c,12c}, ácido linoleico; 20:0, ácido araquídico; 22:0, ácido behénico.

En cuanto a su composición, el aceite de girasol tiene una serie de características positivas entre las que podemos destacar una composición saludable de ácidos grasos (Katan et al., 1995; Mensink et al., 2003), un alto contenido en tocoferoles (Ayerdi Gotor y Rhazi, 2016; Velasco y Ruiz-Méndez, 2015) y la presencia otros componentes minoritarios beneficiosos para la salud como fitoesteroles, escualeno, carotenoides, ácidos fenólicos y coenzimas Q9 y Q10, si bien, al igual que ocurre con los tocoferoles, durante el proceso de refinación el aceite de girasol pierde cantidades considerables de estos componentes (Ayerdi Gotor y Rhazi, 2016; Velasco y Ruiz-Méndez, 2015).

El aceite de girasol presenta además una buena estabilidad frente a la oxidación porque a diferencia de aceites obtenidos de otros cultivos oleaginosos como la soja o la colza, este contiene muy bajas cantidades del ácido graso poliinsaturado linolénico. A esta estabilidad contribuyen también los ya mencionados tocoferoles que actúan como antioxidantes naturales. Por todo ello, el aceite de girasol es un aceite comestible excelente, considerado de mejor calidad que otros aceites de origen vegetal (Salas et al., 2015).

A pesar de las buenas características que posee el aceite de girasol, este cultivo, al igual que ha ocurrido con otros cultivos oleaginosos, ha sido objeto de numerosos estudios con el fin de buscar nuevas líneas cuyas características estén adaptadas a aplicaciones específicas. En las últimas

décadas se han producido muchas líneas de girasol con composiciones de ácidos grasos modificadas como son los ya comerciales girasoles alto oleico y medio oleico (Tabla 1; [Garcés et al., 2011](#); [Kleingartner, 2002](#)). También se han conseguido algunos mutantes de girasol con altos contenido de ácidos grasos saturados, palmítico o esteárico, que podrían ser una buena alternativa a las grasas tropicales ([Garcés et al., 2009](#)), además de aceites con composiciones de tocoferoles modificadas ([Velasco et al., 2004](#); [García-Moreno et al., 2006](#)). A diferencia de otros cultivos oleaginosos como la soja o la canola, que han sido modificados mediante ingeniería genética, la mayoría de las mejoras y modificaciones del girasol se han realizado mediante técnicas tradicionales de mejora vegetal, como cruzamientos selectivos, mutagénesis y selección ([Salas et al., 2015](#)). La existencia de variedades silvestres posibilita además la transferencia de caracteres hacia la variedad doméstica para la mejora del cultivo ([Lexer et al., 2003](#)).

1.2. LÍPIDOS

1.2.1. DEFINICIÓN, CLASIFICACIÓN Y FUNCIONES DE LOS LÍPIDOS

Tradicionalmente los lípidos se han definido como un grupo de compuestos de origen natural, que se caracterizan por ser insolubles en agua y solubles en disolventes orgánicos, tales como hidrocarburos, cloroformo, benceno, éteres y alcoholes ([AOCS Lipid Library](#)). Aunque esta definición basada únicamente en la solubilidad sigue apareciendo en algunos textos generales de bioquímica, se trata de una definición muy imprecisa. Así, existen muchos otros compuestos, como vitaminas y carotenoides, que entrarían dentro de la misma ([Badui Dergal, 2006](#)), y por otra parte, muchas de las sustancias que son ampliamente consideradas como los lípidos no obedecen esta simple regla ([Brown y Murphy, 2009](#)). Con el objetivo de dar solución a la ambigüedad de esta definición, en el 2005, el Comité Internacional de Clasificación y Nomenclatura de Lípidos (ILCNC, *International Lipids Classification and Nomenclature Committee*) bajo el respaldo del consorcio LIPID MAPS (*The Lipid Metabolites and Pathways Strategy*) propuso una nueva definición mucho más exhaustiva, basada en el origen biosintético de los lípidos, y estableció un sistema de clasificación compatible con las bases de datos y necesidades informáticas actuales. Así, los lípidos quedaron definidos como pequeñas moléculas hidrófobas o anfipáticas que pueden originarse, en su totalidad o en parte, mediante condensaciones de tioésteres de cetoacilo basadas en carbaniones (ácidos grasos, glicerolípidos, glicerofosfolípidos, esfingolípidos, sacarolípidos y policétidos) y/o por condensaciones de unidades de isopreno basadas en carbocationes (prenoles y esteroides) ([Fahy et al., 2005, 2009 y 2011](#)). En base a esta definición los lípidos se clasificaron en ocho categorías diferentes: ácidos grasos, glicerolípidos, glicerofosfolípidos, esfingolípidos, esteroides, prenoles, sacarolípidos y policétidos.

Gracias a la enorme diversidad de sus estructuras los lípidos desempeñan numerosas e importantes funciones, siendo constituyentes esenciales de toda célula vegetal. Sirven de reserva energética y de carbono, y por ello, en especies vegetales oleaginosas estos se acumulan en la semilla o el fruto durante la maduración, generalmente en forma de TAG, y son degradados posteriormente para sustentar el crecimiento de la plántula durante las primeras etapas de la germinación. Los ácidos grasos resultantes de esta degradación se emplean para la producción de poder reductor y acetyl-CoA o para la síntesis de nuevos lípidos ([Harwood, 1979](#)).

Los lípidos son además componentes estructurales de las membranas celulares actuando como barreras para separar las células y para delimitar los compartimentos celulares ([Brown y Murphy, 2009](#)). Las membranas celulares tienen composiciones lipídicas distintas y específicas que contribuyen a su identidad. Así, por ejemplo, en las membranas del retículo endoplásmico (RE) los principales lípidos son la fosfatidilcolina (PC) y la fosfatidiletanolamina (PE), mientras que en los plastidios abundan glicerolípidos sin fosfato tales como los galactolípidos, monogalactosildiacilglicerol (MGDG) y digalactosildiacilglicerol (DGDG), y el sulfolípido sulfoquinovosildiacilglicerol (SQDG) ([Moreau et al., 1998](#)). En general, los fosfolípidos se consideran los glicerolípidos más ubicuos en las membranas de las células vegetales ([Moreau et](#)

al., 1998). Hay que tener en cuenta que la composición de ácidos grasos de los lípidos de la membrana afecta a su fluidez, que es una propiedad fundamental para las plantas a la hora de adaptarse a cambios ambientales como las heladas (Cook, 1996; Nishida y Murata, 1996).

Otros lípidos están implicados en procesos biológicos fundamentales, como la transducción de señales, actuando como precursores en la síntesis de hormonas como el ácido jasmónico y de segundos mensajeros como el inositol fosfato. Además, son biomoléculas claves en la fotoprotección, la modificación post-traducciona l de proteínas, el reconocimiento celular y la adaptación al frío y otros factores medioambientales (Harwood, 1996, 2007).

A continuación, se describirán con más detalle los ácidos grasos, los glicerolípidos y los glicerofosfolípidos.

1.2.2. ÁCIDOS GRASOS

1.2.2.1. Definición, clasificación y funciones

Según su definición más estricta, el término ácido graso se restringe a cualquier ácido monocarboxílico alifático derivado o contenido en forma esterificada en una grasa, aceite o cera animal o vegetal (IUPAC-IUB, 1995). Sin embargo, algunos químicos y bioquímicos se refieren a todos los ácidos carboxílicos no ramificados como ácidos grasos, independientemente de su origen.

Los ácidos grasos se pueden clasificar en base al número de dobles enlaces, diferenciándose ácidos grasos saturados (sin dobles enlaces, SFA, *Saturated Fatty Acid*), monoinsaturados (con un solo doble enlace, MUFA, *MonoUnsaturated Fatty Acid*) o poliinsaturados (con dos o más dobles enlaces, PUFA, *Polyunsaturated Fatty Acid*). Para describir la geometría del doble enlace se suele usar la nomenclatura *cis/trans*. Dos ligandos unidos cada uno a un átomo diferente del doble enlace tienen una posición relativa entre sí tipo *cis* si se encuentran en el mismo lado del plano de referencia y *trans* si se encuentran en lados opuestos, siendo el plano de referencia el perpendicular al de los enlaces σ y que pasa a través del doble enlace (IUPAC-IUB, 1996). Aunque los términos *cis* y *trans* no dan lugar a ambigüedad cuando se tienen sólo dos tipos de sustituyentes en el doble enlace, se ha propuesto que en las bases de datos lipidómicas y bioinformáticas estos sean substituidos por los términos *Z* y *E*, que se asignan siguiendo reglas de prioridad para los sustituyentes (Scrimgeour y Harwood, 2007; Fahy et al., 2005).

Los ácidos grasos también se pueden agrupar en base a la longitud de sus cadenas carbonadas. Aunque no se ha llegado a un consenso internacional para definir los subtipos de ácidos grasos en función de las longitudes de las cadenas, expertos de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, 2012) recomiendan las siguientes definiciones:

Para los ácidos grasos saturados:

- Cadena corta: de 3 a 7 átomos de carbono.
- Cadena media: de 8 a 13 átomos de carbono.
- Cadena larga: de 14 a 20 átomos de carbono.
- Cadena muy larga: con 21 o más átomos de carbono.

Para los ácidos grasos insaturados:

- Cadena corta: con 19 o menos átomos de carbono.
- Cadena larga: de 20 a 24 átomos de carbono.
- Cadena muy larga: con 25 o más átomos de carbono.

En las plantas, los ácidos grasos modulan una variedad de respuestas a estrés biótico o abiótico, jugando un papel importante en la defensa de patógenos (Rustan y Drevon, 2005; Kachroo y Kachroo, 2009). Además, como ya se ha mencionado con anterioridad, se emplean como reserva energética y son componentes esenciales de los lípidos de membrana (Cook, 1996; Nishida y Murata, 1996).

1.2.2.2. Propiedades físico-químicas

La coexistencia de un grupo carboxilo hidrofílico y una cadena hidrocarbonada hidrofóbica convierte a los ácidos grasos en moléculas débilmente anfipáticas, gracias a lo cual pueden organizarse en la interfase lípido-agua y pueden formar micelas en solución acuosa. Cuanto más corta sea la cadena hidrocarbonada y mayor el grado de insaturación de los ácidos grasos, mayor será la polaridad de los mismos. Los ácidos grasos pierden su condición anfipática cuando establecen enlaces tipo éster con otras moléculas a través de su grupo carboxilo, confiriendo al lípido resultante un marcado carácter hidrofóbico (Rustan y Drevon, 2005).

El punto de fusión de un lípido está determinado por la facilidad con que sus residuos acilo forman estructuras organizadas. Los ácidos grasos saturados se organizan en estructuras paralelas de forma que las pequeñas distancias entre las cadenas hidrocarbonadas permiten unas buenas interacciones de *Van der Waals* entre los grupos metilenos, lo que explica sus elevados puntos de fusión. A mayor número de átomos de carbono de la cadena, mayor será la temperatura de fusión del ácido graso. En cuanto a los ácidos grasos insaturados, cíclicos o ramificados, al no poder disponerse en paralelo, tienen menos posibilidad de interactuar entre sí para formar estructuras estables y presentan por tanto un punto de fusión menor.

Además, el punto de fusión puede variar en función del tipo de isomería que presentan los dobles enlaces. Los enlaces *cis* forman codos en las cadenas de los ácidos grasos (Figura 5), aumentando el espacio entre ellas, disminuyendo la capacidad de asociación y, en consecuencia, disminuyendo el punto de fusión (Rustan y Drevon, 2005). Por su parte, los enlaces *trans* no introducen más que un pequeño ángulo en la cadena (Figura 5), de forma que el punto de fusión del ácido graso con este enlace no variará mucho con respecto al punto de fusión del ácido graso saturado homólogo (Cook, 1996). Por todo esto, los lípidos ricos en ácidos grasos saturados de cadena larga serán sólidos a temperatura ambiente (grasas), mientras que los lípidos ricos en ácidos grasos de cadena corta o insaturados, serán líquidos a temperatura ambiente (aceites).

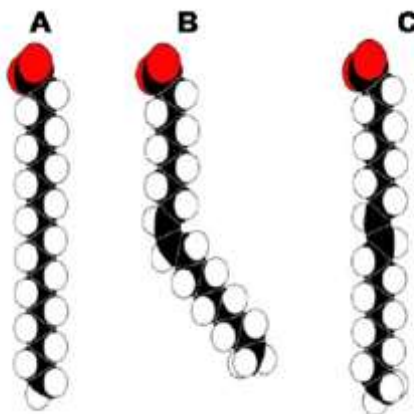


Figura 5. Estructuras de distintos tipos de ácidos grasos. A) Ácido graso saturado (esteárico, 18:0). B) Ácido graso insaturado *cis* (oleico, 18:1^{Δ9c}). C) Ácido graso insaturado *trans* (elaídico, 18:1^{Δ9t}).

1.2.2.3. Nomenclatura

Existen tres maneras de denominar a los ácidos grasos. La nomenclatura sistemática, el nombre común y la nomenclatura abreviada o numérica.

Nomenclatura sistemática: Esta nomenclatura sigue las reglas de la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (*International Union of Pure and Applied Chemistry*, IUPAC) (IUPAC-IUB, 1978). El nombre sistemático de un ácido graso deriva del nombre de su cadena hidrocarbonada reemplazando la *-o* final del correspondiente alcano por *-oico* y precediéndolo por la palabra *ácido*. Si hubiera insaturaciones o sustituyentes, la localización de los mismos se identificaría por un número, empezando la numeración de la cadena por el carbono del grupo carboxilo. Convencionalmente, se identifica un enlace específico por el número más bajo de los dos carbonos que enlaza. Los dobles enlaces se señalan con la terminación *-enoico*. La estereoquímica del doble enlace se especifica usando los términos *cis* y *trans*, que pueden sustituirse por *Z* y *E* respectivamente.

Nombre común: La mayoría de los principales ácidos grasos poseen un nombre común impuesto históricamente que no proporciona ninguna información sobre la estructura química de los mismos y que, en muchos casos, está relacionado con la fuente de donde fueron aislados por primera vez. Debido a la comodidad que supone el uso de estos nombres, podemos encontrarlos frecuentemente en artículos científicos y también serán usados en el presente texto.

Nomenclatura abreviada o numérica: Es la forma más utilizada de nombrar a los ácidos grasos. Esta nomenclatura incluye dos números separados por dos puntos. El primer número indica la longitud de la cadena de átomos de carbono y el segundo indica el número de dobles enlaces que contiene la molécula. La posición de los dobles enlaces puede especificarse mediante tres sistemas diferentes (Rustan y Drevon, 2005):

- *Sistema delta (Δ):* En este sistema se especifica la posición de todos los dobles enlaces tomando como referencia el grupo carboxilo terminal, al que se le asigna el número 1. Además, también se especifica la conformación *cis/trans* de los mismos. Hay que tener en cuenta que esta nomenclatura no se puede aplicar a ácidos grasos con cadenas ramificadas, con heteroátomos o con triples enlaces, ni a otros ácidos grasos con rasgos estructurales poco comunes. La posición y

conformación de los dobles enlaces se especifican en un superíndice en la parte superior derecha cuando sea necesario (por ejemplo, 18:1^{Δ9t} o 18:1^{Δ9E}). Cuando se trabaja con los ácidos grasos naturales más comunes (oleico, linoleico, linolénico, etc.) estos superíndices se suelen obviar y se identifica al ácido graso sólo con los dos números principales (18:1, 18:2, 18:3, etc.).

- *Sistema omega (ω)*: En este sistema se especifica la posición del primer doble enlace tomando en este caso como referencia el grupo metilo terminal. Este sistema se puede aplicar sólo a ácidos grasos insaturados *cis* y a ácidos grasos poliinsaturados *cis* cuyos dobles enlaces estén separados por un metileno. Este sistema define con facilidad las diferentes familias o series de ácidos grasos, tales como ω-3, ω-6 y ω-9.
- *Sistema n*: Consiste en sustituir ω-x del sistema ω por n-x. Es una recomendación de la IUPAC.

En la Tabla 2 se indican los nombres de los ácidos grasos más comunes en plantas según diferentes nomenclaturas.

Tabla 2. Nombres de los ácidos grasos más comunes en los lípidos de plantas.

Nombre común	Nombre sistemático	Nombre abreviado
Láurico	Dodecanoico	12:0
Mirístico	Tetradecanoico	14:0
Palmítico	Hexadecanoico	16:0
Palmitoleico	<i>cis</i> -9-Hexadecanoico	16:1 ^{Δ9c}
Esteárico	Octadecanoico	18:0
Oleico	<i>cis</i> -9-Octadecanoico	18:1 ^{Δ9c}
Linoleico	<i>cis,cis</i> -9,12-Octadecenoico	18:2 ^{Δ9c,12c}
α-linolénico	<i>cis,cis,cis</i> -9,12,15-Octadecatrienoico.	18:3 ^{Δ9c,12c,15c}
γ-linolénico	<i>cis,cis,cis</i> -6,9,12-Octadecatrienoico	18:3 ^{Δ6c,9c,12c}
Araquídico	Eicosanoico	20:0
Gondoico	<i>cis</i> -11-Eicosenoico	20:1 ^{Δ11c}
Behénico	Docosanoico	22:0
Erúxico	<i>cis</i> -13-Docosenoico	22:1 ^{Δ13c}
Lignocérico	Tetracosanoico	24:0

1.2.2.4. Ácidos grasos en la naturaleza

Los ácidos grasos naturales suelen tener una cadena de 4 a 28 carbonos, normalmente no son ramificados y tienen un número par de átomos de carbono (IUPAC-IUB, 1995).

Los *ácidos grasos saturados* más abundantes en la naturaleza son los de cadena lineal de 14, 16 y 18 átomos de carbono, aunque se han encontrado ácidos grasos saturados en forma esterificada con longitudes desde 2 a 36 átomos de carbono. El ácido graso saturado más abundante en animales, plantas y microorganismos es el ácido palmítico (16:0). El ácido esteárico (18:0) es importante en animales y en algunos hongos, siendo un componente minoritario en la mayoría de las plantas. El ácido mirístico (14:0) tiene una presencia más generalizada apareciendo en distintos aceites vegetales como el de coco o el de palma y en la grasa de algunos animales.

Ácidos grasos saturados de cadena corta con 8 a 10 átomos de carbono se encuentran en los lípidos de la leche (Rustan y Drevon, 2005).

Los *ácidos grasos monoinsaturados* más abundantes son los lineales de 16 y 18 átomos de carbono, aunque se han encontrado ácidos grasos monoinsaturados con longitudes de cadena desde 10 a 36 átomos de carbono en forma esterificada (Christie, 2019). Los dobles enlaces normalmente presentan la conformación *cis* aunque, de manera menos frecuente, también se encuentran en la naturaleza ácidos grasos con enlaces *trans*, como los encontrados en grasas derivadas de rumiantes. Hay que destacar que las grasas alimentarias que han sido hidrogenadas industrialmente sí presentan ácidos grasos con dobles enlaces en conformación *trans* (Scrimgeour y Harwood, 2007; Christie, 2019). El ácido graso monoinsaturado más abundante en vegetales y animales es con diferencia el ácido oleico ($18:1^{\Delta 9c}$), ácido graso que también está presente en microorganismos. El ácido palmítico ($16:1^{\Delta 9c}$) también es importante en animales, plantas y microorganismos, siendo componente principal de algunos aceites de semillas (Rustan y Drevon, 2005).

Los *ácidos grasos poliinsaturados* cuyos enlaces dobles, normalmente en conformación *cis*, están separados por grupos metilenos se encuentran bastante extendidos en animales y plantas. Los ácidos grasos diinsaturados con dobles enlaces conjugados se encuentran en tejidos de animales rumiantes y en los productos lácteos, pero son poco frecuentes en fuentes vegetales. En plantas superiores, rara vez se encuentran ácidos grasos con más de tres dobles enlaces, pero en algas y animales se encuentran ácidos grasos con hasta seis insaturaciones. Los ácidos grasos poliinsaturados de 18 carbonos linoleico ($18:2^{\Delta 9c,12c}$) y α -linolénico ($18:3^{\Delta 9c,12c,15c}$) son los componentes principales de la mayoría de los lípidos de plantas, encontrándose en muchos de los aceites vegetales de importancia comercial. El ácido linoleico es el componente mayoritario de muchos aceites de semillas como el de girasol, maíz y cacahuete, mientras que el ácido α -linolénico se encuentra en proporciones importantes en aceites como el de soja, linaza y germen de trigo. Ambos ácidos grasos son esenciales ya que no podemos sintetizarlos y debemos obtenerlos de la dieta (Burdge y Calder, 2005; Graham et al., 2007). Entre los PUFA con más de tres dobles enlaces destacan el ácido eicosapentaenoico ($20:5^{\Delta 5c,8c,11c,14c,17c}$) y el ácido docosahexaenoico ($22:6^{\Delta 4c,7c,10c,13c,16c,19c}$), que se encuentran en altos porcentajes en algas y pescados (Rodríguez-Barrón, 2008), y el ácido araquidónico ($20:4^{\Delta 5c,8c,11c,14c}$) que en animales es un componente principal de los fosfolípidos y que también se encuentra en algas y pescado (Rustan y Drevon, 2005).

En resumen, los ácidos grasos más abundantes en las plantas superiores son el palmítico, esteárico, oleico, linoleico y α -linolénico (Harwood, 1979; Ohlrogge y Browse, 1995; Thelen y Ohlrogge, 2002). Sin embargo, se han encontrado en el reino vegetal hasta 300 especies diferentes de los mismos con una gran variedad en cuanto a longitud, número y tipo de insaturaciones y grupos funcionales. Así, se han identificado ácidos grasos con dobles enlaces en posiciones poco comunes, triples enlaces, ramificaciones y sustituyentes como grupos hidroxilo, epoxi, anillos de ciclopropano, etc., que confieren a los lípidos características de gran valor para la industria (Napier, 2007; Bates, 2016; Bates y Browse, 2012; Baud y Lepiniec, 2010; Dyer et al., 2008). Estos ácidos grasos con estructuras poco frecuentes son característicos de determinados grupos o especies vegetales.

1.2.3. GLICEROLÍPIDOS

Los glicerolípidos son lípidos cuya estructura básica común es la molécula de glicerol (propanotriol). El glicerol puede estar mono-, di- o triesterificado con uno o varios ácidos grasos (acilglicérol; Figura 6), puede contener carbohidratos en posición *sn-3* unidos por enlace *O*-glicosídico (glicosilglicérol) o bien contener grupos alquilo (alquilglicérol) o 1Z-alqueno (1Z-alquenoilglicérol) (Fahy et al., 2005, 2009; AOCS Lipid Library). El consorcio LIPID MAPS tomó la decisión arbitraria de no incluir los glicerofosfolípidos dentro de esta categoría, a pesar de que estos lípidos también contienen el grupo glicerol como estructura básica.

Con el fin de designar la estereoquímica de los glicerolípidos, los átomos de carbono del glicerol se enumeran estereoespecíficamente mediante el sistema de numeración *sn*-. En este sistema, los carbonos se numeran como 1, 2 y 3 desde arriba hacia abajo cuando la molécula de glicerol se dibuja en una proyección de Fischer con el grupo hidroxilo secundario a la izquierda del átomo de carbono proquiral central. Las moléculas que están numeradas estereoespecíficamente de esta manera se nombran con el prefijo "*sn*" precediendo al término "glicerol". Cuando los sustituyentes en posiciones *sn*-1 y *sn*-3 son diferentes, el glicerolípidos puede presentar un carbono asimétrico que dota a la molécula de quiralidad (Scrimgeour y Harwood, 2007; Eichmann y Lass, 2015).

Entre los distintos glicerolípidos, se describirán con más detalle los diacilgliceroles y los triacilgliceroles por su importancia en la presente tesis.

Diacilgliceroles (DAG)

Los DAG están formados por una molécula de glicerol esterificada con ácidos grasos en dos de sus grupos hidroxilos. Debido a la presencia de un grupo hidroxilo libre los DAG tienen carácter anfipático. Aunque los DAG rara vez están presentes en altas concentraciones en tejidos de animales y plantas, estos cumplen importantes funciones. Están implicados en múltiples procesos metabólicos, como la síntesis de glicerolípidos o glicerofosfolípidos, juegan un papel importante en procesos de señalización y además forman parte de las membranas celulares (Eichmann y Lass, 2015; Miège y Maréchal, 1999; AOCS Lipid Library).

La biosíntesis de DAG puede llevarse a cabo mediante diferentes reacciones enzimáticas. Así, pueden generarse por hidrólisis de TAG o fosfolípidos por acción de lipasas o fosfolipasas, por desfosforilación del ácido fosfatídico (PA) por acción de fosfatasas, por acilación del monoacilglicerol (MAG) catalizada por aciltransferasas o durante la síntesis de esfingomielina a través de ciertas transferasas (Eichmann y Lass, 2015).

Los DAG pueden presentarse como tres isómeros diferentes, *sn*-1,2-DAG, *sn*-2,3-DAG (ambos denominados α,β -DAG) y *sn*-1,3-DAG (denominado α,α' -DAG). Los isómeros *sn*-1,2- y *sn*-2,3-DAG son enantiómeros y poseen un centro quiral en posición *sn*-2. El isómero *sn*-1,3-DAG puede o no presentar un centro quiral en función de los ácidos grasos esterificados. Así, si los dos ácidos grasos son iguales la molécula será aquiral y si son distintos será quiral (Figura 6). Los distintos isómeros de DAG pueden presentar diferentes funciones y destinos celulares ya que las enzimas implicadas en el metabolismo de lípidos discriminan entre ellos (Eichmann y Lass, 2015).

Los DAG son importantes en la industria de los aceites de semillas ya que pueden ejercer una gran influencia en las propiedades físicas de los mismos incluso cuando están presentes en pequeñas cantidades (AOCS Lipid Library).

Triacilgliceroles (TAG)

Los TAG son triésteres derivados del glicerol y de tres moléculas de ácidos grasos (Figura 6). Se denominan simples u homogéneos cuando contienen el mismo ácido graso esterificado en las tres posiciones de la molécula de glicerol y compuestos o mixtos cuando al menos uno de los ácidos grasos es diferente. Los TAG mixtos presentan quiralidad cuando el carbono en posición *sn*-2 es un carbono asimétrico y esto ocurre cuando las posiciones *sn*-1 y *sn*-3 están esterificadas con ácidos grasos diferentes.

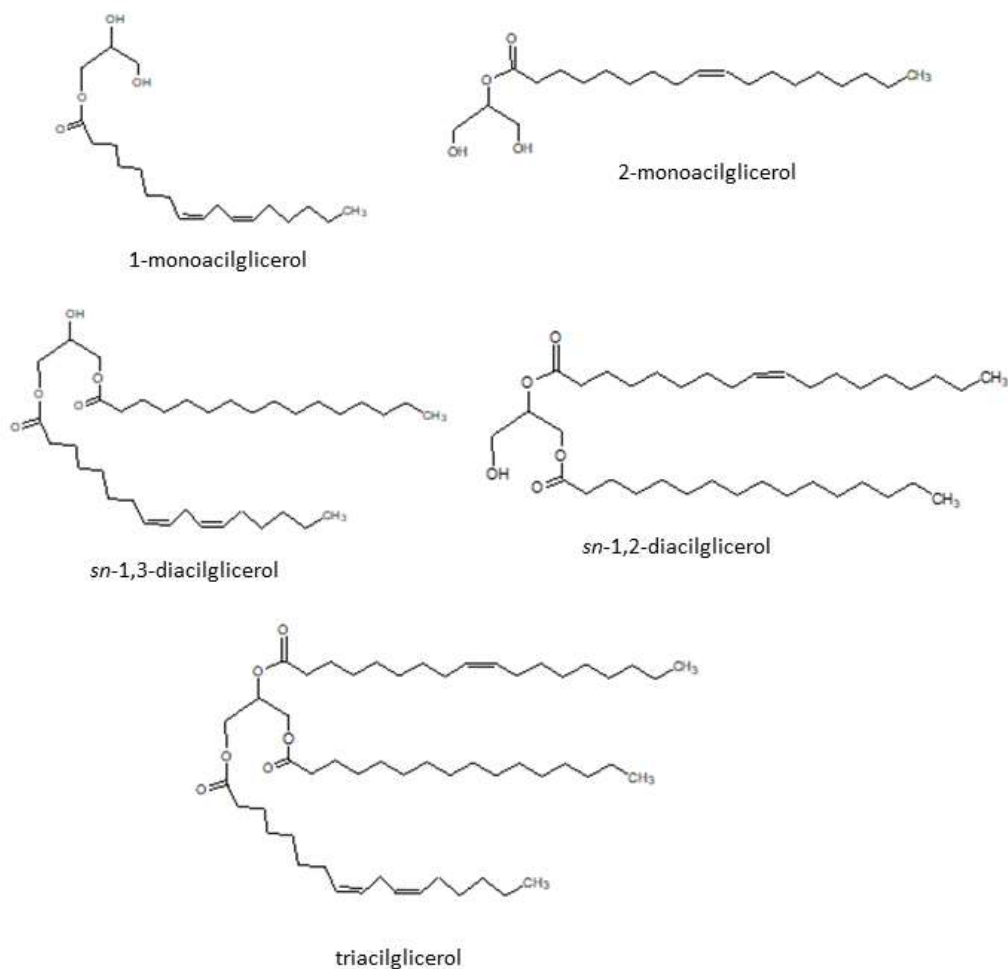


Figura 6. Ejemplos de distintos glicerolípidos.

Los TAG son moléculas neutras compactas en un estado químico reducido que sirven de almacenamiento de energía y carbono en los organismos y son el componente principal de los aceites (Li-Beisson et al., 2013; Venegas-Calderón et al., 2015). Presentan un poder calorífico tras oxidación completa de 9 Kcal/g frente a los aproximadamente 4 Kcal/g de los carbohidratos y proteínas (Berg et al., 2002).

En las plantas los TAG se acumulan en oleosomas, orgánulos intracelulares comprendidos por una matriz de TAG rodeada de una monocapa de fosfolípidos y proteínas especializadas (Parthibane et al., 2012). La cantidad de aceite almacenado en las diferentes especies de plantas es muy variable, oscilando entre el 1 y el 60% del peso seco de la semilla (Ohlrogge y Browse, 1995; Venegas-Calderón et al., 2015). En concreto, las semillas de girasol se caracterizan por tener un alto contenido en aceite que supone alrededor del 50% (p/p) (Autino et al., 1993; Bockisch, 1998). Aunque los TAG se acumulan principalmente en las semillas y frutos, también se encuentran en otras partes de las plantas como en el polen o en tejidos vegetativos (Venegas-Calderón et al., 2015; Murphy et al., 2001; Li-Beisson et al., 2013; AOCS Lipid Library).

Las propiedades características de los aceites vegetales de cada planta vienen determinadas en gran medida por la composición de ácidos grasos de sus TAG y por la disposición o conformación estereoespecífica que ocupan éstos en la molécula de glicerol (Rodríguez-Barrón, 2008, Bates y Browse, 2012). En los TAG los ácidos grasos no están esterificados al azar, aunque su distribución tampoco es absolutamente específica (Baud y Lepiniec, 2010; McGarry, 2004). La composición de ácidos grasos en las distintas posiciones vendrá determinada principalmente por la selectividad de la aciltransferasa implicada y la disponibilidad relativa de los diferentes ácidos grasos en el reservorio de acil-CoAs (McGarry, 2004; Ichihara, 1991). En los aceites de semillas, los ácidos grasos saturados suelen ocupar las posiciones *sn*-1 y *sn*-3, los monoinsaturados suelen distribuirse de forma relativamente uniforme y los poliinsaturados suelen ocupar las posiciones *sn*-2 (Baud y Lepiniec, 2010; McGarry, 2004). Hay que destacar, que la composición de la posición *sn*-2 tanto de los TAG como de los glicerofosfolípidos es de gran importancia, ya que esta posición facilita la absorción de estos ácidos grasos como 2-monoacil-*sn*-gliceroles que se utilizan en la resíntesis de los TAG y de los glicerofosfolípidos, que se lleva a cabo después de la absorción de las grasas (FAO, 2012; Lehner y Kuksis, 1996).

Gracias a la biotecnología, hoy en día es posible modificar el perfil de ácidos grasos de los aceites vegetales enriqueciéndolos con ácidos grasos con efectos beneficiosos para la salud o bien con ácidos grasos que posean propiedades químicas útiles para la industria (Napier y Graham, 2010; Damude y Kinney, 2008). Con este fin, en los últimos años se han realizado considerables esfuerzos por comprender las rutas metabólicas implicadas en la biosíntesis de lípidos, identificando y caracterizando funcionalmente las enzimas implicadas en dichas rutas y determinando las contribuciones relativas de las mismas (Napier et al., 2014; Napier y Graham, 2010; Clemente y Cahoon, 2009; Cahoon et al., 2007).

1.2.4. GLICEROFOSFOLÍPIDOS

Los glicerofosfolípidos son lípidos cuya estructura básica consiste en una molécula de glicerol esterificada normalmente con ácidos grasos en posiciones *sn*-1, *sn*-2 o ambas y con un grupo fosfato o fosfonato en *sn*-3 (Fahy et al., 2011). Aunque normalmente los grupos hidroxilos de las posiciones *sn*-1 y *sn*-2 están acilados con ácidos grasos, también hay glicerofosfolípidos enlazados con alquilos o 1Z-alquenos. De igual forma, aunque el grupo fosfato o fosfonato se suele encontrar en posición *sn*-3, existen algunos glicerofosfolípidos con este grupo en posición *sn*-1 (Fahy et al., 2009). Cuando una de las posiciones, *sn*-1 o *sn*-2, se encuentra ocupada por un grupo hidroxilo, el compuesto derivado se denomina liso-compuesto; por ejemplo, lisofosfatidilcolina (LPC).

Estas moléculas tienen carácter anfipático debido a que las cadenas de ácidos grasos constituyen colas hidrofóbicas mientras que el ácido fosfórico esterificado constituye una cabeza polar (Schmid et al., 1997). La esterificación del ácido fosfórico en la posición *sn*-3 confiere asimetría a la molécula (Figura 7), de forma que el segundo carbono de los glicerofosfolípidos es un centro quiral.

Los glicerofosfolípidos son elementos estructurales indispensables de las membranas celulares, están implicados en la síntesis de diversas moléculas, entre ellas los TAG, y actúan además como señales moleculares regulando algunos eventos metabólicos.

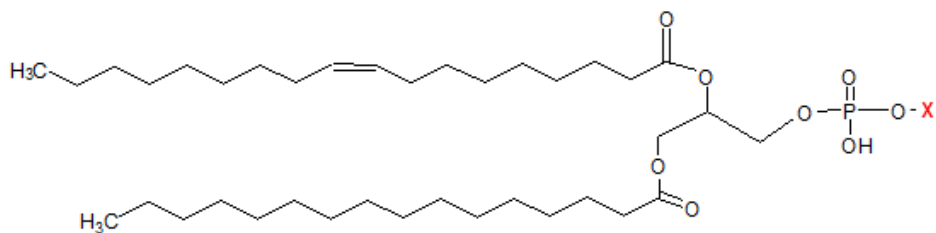


Figura 7. Ejemplo de un glicerofosfolípido. Los sustituyentes más comunes en la posición **x** son la N,N,N-trimetiletanolamina o colina, la etanolamina, el glicerol, el aminoácido serina o el polialcohol inositol. El ácido fosfatídico o fosfatidato, donde no existe sustituyente en la posición **x**, también es un componente común de esta familia de compuestos.

Los distintos tipos de fosfolípidos se clasifican según la naturaleza de sus grupos de cabeza polar. Los glicerofosfolípidos más relevantes en plantas son:

Ácido fosfatídico o 1,2-diacil-*sn*-glicerol-3-fosfato (PA)

El ácido fosfatídico es un DAG con un grupo fosfato esterificado en posición *sn*-3, que le confiere carga negativa (lípidio aniónico). A pesar de no ser un fosfolípido muy abundante en plantas es extremadamente importante como intermediario en la biosíntesis de TAG y fosfolípidos así como segundo mensajero, modulando el crecimiento y el desarrollo de la raíz y los tubos polínicos y regulando la respuesta a numerosos estreses bióticos y abióticos (Dörmann, 2005; Ohlrogge y Browse, 1995; Testerink y Munnik, 2005 y 2011). En las plantas, el PA se sintetiza principalmente tras la acción catalítica de la enzima fosfolipasa D (PLD) sobre los fosfolípidos de membrana pero también puede producirse mediante la acción secuencial de la fosfolipasa C (PLC) y la diacilglicerol quinasa (DGK) (Arisz et al., 2009; Munnik y Testerink, 2009). Además, puede ser sintetizado a partir de ácido lisofosfatídico (LPA) tanto en el retículo endoplásmico (Kim et al., 2005) como en el cloroplasto (Kim y Huang, 2004; Yu et al., 2004).

Fosfatidilcolina o 1,2-diacil-*sn*-glicerol-3-fosforilcolina (PC)

La fosfatidilcolina es un molécula con geometría molecular casi cilíndrica, que deriva de PA con una molécula de colina esterificada al grupo fosfato. Se trata de un fosfolípido con carga total cero o zwitteriónico en un amplio rango de pH (AOCS Lipid Library). Es el principal fosfolípido de la mayoría de las membranas eucariotas. Tiene la capacidad de formar espontáneamente bicapas en las que las colas lipídicas están enfrentadas entre sí y los grupos de cabeza polar se encuentran dirigidos hacia la fase acuosa (van Meer et al., 2008). Este fosfolípido es el sustrato sobre el que se producen múltiples modificaciones sobre los ácidos grasos como desaturaciones, hidroxilaciones, y epoxidaciones, y está implicado en el suministro de estos ácidos grasos modificados para la síntesis de TAG (Wickramarathna et al., 2015; Bates, 2016). La principal ruta de síntesis *de novo* de PC en animales y plantas implica la acción de la enzima CDP-colina:diacilglicerol colinafosfotransferasa (DAG-CPT) que cataliza la transferencia del grupo fosfocolina desde la citidinadifosfocolina (CDP-colina) a DAG (Vogel y Browse, 1996; AOCS Lipid Library).

Fosfatidiletanolamina o 1,2-diacil-*sn*-glicerol-3-fosforetanolamina (PE)

Tras PC, es el segundo fosfolípido más abundante en animales y plantas, donde forma parte de las membranas, principalmente de la cara citosólica de la membrana plasmática. Se trata también de un fosfolípido zwitteriónico en un amplio rango de pH (AOCS Lipid Library). Su estructura es

similar a la de PC pero con una pequeña molécula de etanolamina sustituyendo la colina, lo cual hace que este fosfolípido adquiera una geometría molecular cónica. Debido a esta geometría, la inclusión de este fosfolípido en las bicapas de PC ejerce una presión lateral que proporciona a la membrana cierta curvatura (van Meer et al., 2008). A través de su grupo amino ionizable puede establecer puentes de hidrógeno con una amplia variedad de residuos aminoacídicos de las proteínas de membrana, estabilizando la conformación óptima de estas y preservando sus funcionalidades (Gibellini y Smith, 2010). La principal ruta de síntesis *de novo* de PE en animales y plantas se basa en la acción catalítica de la enzima CDP-etanolamina:diacilglicerol etanolaminafosfotransferasa (DAG-EPT) que cataliza la transferencia del grupo fosfoetanolamina desde la citidinadifosfoetanolamina (CDP-etanolamina) a DAG.

Fosfatidilserina o 1,2-diacil-sn-glicerol-3-fosfo-L-serina (PS)

Este fosfolípido contiene el aminoácido serina esterificado al grupo fosfato. Se trata de un fosfolípido ácido (lípidio aniónico) con tres grupos ionizables: el grupo amino con carga positiva y los grupos carboxilo y fosfato con carga negativa. Se localiza en la cara interna de las membranas celulares, especialmente en las que constituyen el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi, estando totalmente ausente en los cloroplastos (Vance y Steenbergen, 2005). Aunque suele encontrarse en pequeñas cantidades, juega un papel muy importante en las membranas ya que, debido a su carácter aniónico, puede interaccionar con las proteínas cargadas positivamente, facilitando el contacto entre estas y sus receptores ligados a la membrana (AOCS Lipid Library). Además, es precursor de otros fosfolípidos y está implicado en el proceso de muerte celular programada (apoptosis) (Cowan, 2006). El mecanismo de biosíntesis de PS varía entre las distintas especies de plantas. Así, en algunas plantas se ha descrito la síntesis de PS mediante la acción catalítica de la enzima BE-PSS (*Base-Exchange-type PS Synthase*) que cataliza la reacción de intercambio de base en la que el grupo cabeza de un fosfolípido se intercambia por L-serina pero también se han encontrado plantas que sintetizan PS mediante la actividad CD-PSS (*CDP-diacylglycerol-dependent PS Synthase*) que utiliza citidina difosfato diacilglicerol (CDP-DAG) y L-serina como substratos (Yamaoka et al., 2011).

Fosfatidilinositol o 1,2-diacil-sn-glicerol-3-fosforilinositol (PI)

Se trata de un fosfolípido ácido (lípidio aniónico) cuya estructura deriva de PA con un grupo inositol (un polialcohol cíclico) unido al grupo fosfato. Es un fosfolípido esencial en las células eucarióticas (Antonsson, 1997; Nikawa y Yamashita, 1997; Jackson et al., 2000; Heilmann, 2016), pues además de formar parte de las membranas, el PI y sus metabolitos regulan un conjunto diverso de procesos celulares como el anclaje de proteínas, la transducción de señales, la exportación de ARN mensajero (ARNm) desde el núcleo, el tráfico de vesículas y también sirven como reservorios de segundos mensajeros (Gardocki et al., 2005). Por lo tanto, incluso una modesta regulación de la síntesis de PI podría tener un profundo impacto biológico y, de hecho, en diferentes estudios en plantas se han observado importantes cambios fenotípicos cuando se perturba el metabolismo de PI (Gardocki et al., 2005; Heilmann, 2016; Gerth et al., 2017). En plantas se sintetiza partir de PA mediante una secuencia de reacciones enzimáticas dependientes de CDP-DAG.

1.3. BIOSÍNTESIS DE LÍPIDOS EN PLANTAS

1.3.1. BIOSÍNTESIS DE ÁCIDOS GRASOS

La síntesis *de novo* de ácidos grasos en plantas tiene lugar en el cloroplasto de los tejidos verdes y en los plastidios de semillas y tejidos no verdes con la participación de dos sistemas multienzimáticos: la acetil-CoA carboxilasa (ACCasa; Konishi et al., 1996) y la sintasa de ácidos grasos (FAS, *Fatty Acid Synthase*; Brown et al., 2006; Harwood, 2005).

La ruta comienza con la generación de malonil-CoA a partir de acetil-CoA y bicarbonato por medio de una reacción dependiente de ATP (adenosín-5'-trifosfato) que cataliza la ACCasa (Sasaki y Nagano, 2004). En la naturaleza se han encontrado dos tipos de ACCasa, la tipo I u homomérica y la tipo II o heteromérica. La mayoría de las plantas contienen la ACCasa tipo I en el citosol y la tipo II en los plastidios, si bien algunas plantas como las pertenecientes a la familia de las gramíneas (*Poaceae*) contienen la tipo I tanto en los plastidios como en el citosol (Sasaki y Nagano, 2004). El complejo multienzimático ACCasa está compuesto por una biotina carboxilasa (BC), una proteína transportadora de biotina y carboxilo (BCCP), y una carboxiltransferasa (CT). La primera reacción de este complejo está catalizada por el dominio BC y consiste en la transferencia de una molécula de dióxido de carbono desde el bicarbonato al grupo prostético de la BCCP, utilizando para ello ATP. La segunda reacción, catalizada por el dominio CT, consiste en la transferencia del grupo carboxilo desde BCCP a acetil-CoA produciendo una molécula de malonil-CoA (Harwood, 1996). A continuación, el grupo malonil del malonil-CoA es transferido al grupo tiol de la ACP (*Acyl Carrier Protein*, proteína portadora de acilos) mediante la acción de la malonil-CoA:ACP transacilasa (MCAT; EC 2.3.1.39) formándose malonil-ACP (Ohlrogge y Browse, 1995). A partir de este punto, la cadena de acilos en crecimiento queda unida a ACP mediante enlace tioéster con el grupo tiol que se encuentra en el grupo prostético (4'-fosfopanteteína) de la ACP.

Los siguientes pasos de esta ruta están catalizados por el complejo multienzimático FAS que realiza la elongación de las cadenas de ácidos grasos hasta 16 o 18 carbonos a través de la adición de dos unidades de carbono que son donados por el malonil-ACP (Slabas et al., 2001). Existen dos tipos de complejos FAS, la tipo I y la tipo II. La FAS tipo I, encontrada en levaduras, animales y en algunas bacterias, consiste en un polipéptido multifuncional que contiene todos los centros de reacción necesarios para la síntesis de ácidos grasos (Wakil et al., 1983; Smith et al., 2003). La FAS tipo II, encontrada en procariontas y plantas, consiste en polipéptidos individuales y monofuncionales que catalizan cada uno un paso individual de la ruta (Figura 8; White et al., 2005; Brown et al., 2006).

La elongación de las cadenas de acilo implica ciclos repetitivos de condensación, reducción, deshidratación y reducción en los que intervienen las siguientes enzimas (Ohlrogge y Browse, 1995):

- *β-cetoacil-ACP sintasa* (KAS, EC 2.3.1.41).
- *β-cetoacil-ACP reductasa* (KAR, EC 1.1.1.100).
- *β-hidroxiacil-ACP deshidratasa* (HAAD, EC 4.2.1.54-61).
- *Enoil-ACP reductasa* (ENR, EC 1.3.1.9).

La condensación inicial entre malonil-ACP y acetil-CoA da lugar a 3-cetobutiril-ACP y una molécula de dióxido de carbono mediante una reacción catalizada por la enzima KAS III (Jaworski et al., 1989). Posteriormente, el grupo ceto del 3-cetobutiril-ACP es reducido a 3-hidroxiacil-ACP, en una reacción dependiente de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido (NADPH) catalizada por la enzima KAR. A continuación, actúa la enzima HAAD que cataliza la deshidratación del producto hidroxilado generando crotonil-ACP (enoil-ACP). Finalmente, el crotonil-ACP es reducido a butiril-ACP en una reacción catalizada por la enzima ENR, obteniéndose así en este primer ciclo un acil-ACP saturado de 4 carbonos (Figura 8).

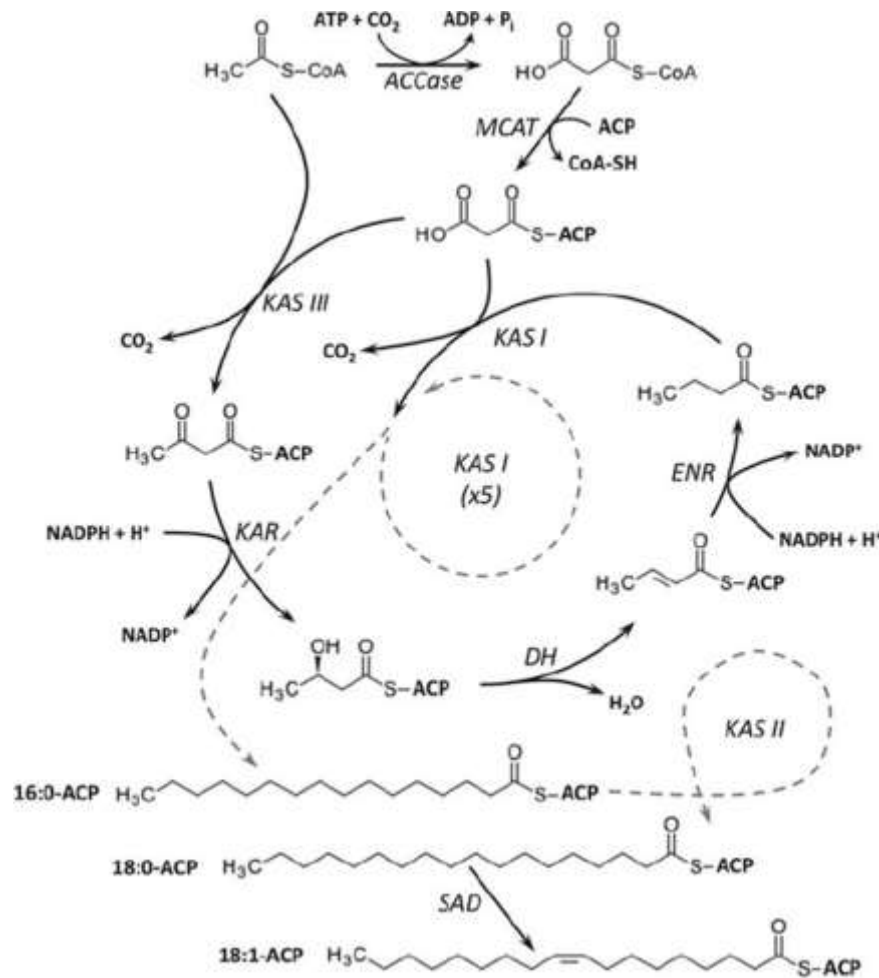


Figura 8. Reacciones implicadas en la síntesis de ácidos grasos. En el proceso existen tres puntos clave. La primera reacción de condensación llevada a cabo por la KAS III donde el malonil-ACP y el acetil-CoA se condensan. La segunda reacción llevada a cabo por la KAS I en la que tras varias reducciones y una deshidratación se forma palmitil-ACP. La tercera reacción, en la que se forma estearil-ACP a partir de palmitil-ACP, es llevada a cabo por la enzima KAS II (Harwood, 2005).

El butiril-ACP vuelve entrar en el ciclo previamente descrito comenzando con una condensación con malonil-ACP y este ciclo se repite 6 veces más obteniéndose un producto de 16 carbonos (16:0-ACP). En estos ciclos la isoforma de la enzima que cataliza la condensación inicial es KAS I, que reemplaza a KAS III en el complejo enzimático tras la primera condensación. Parte del 16:0-ACP va a sufrir un ciclo adicional dando lugar a 18:0-ACP, interviniendo en este caso la isoenzima KAS II. Además de KAS I, II y III en algunas plantas se han descrito isoenzimas adicionales de KAS, como la isoenzima KAS IV encontrada en ciertas especies de *Cuphea* que participa en la condensación de ácidos grasos de cadena media de 8 a 12 carbonos (Dehesh et al., 1998).

En general, una vez que la cadena de acil-ACP llega a 16 o 18 átomos de carbono es sustrato para distintas reacciones en el plastidio. Gracias a la acción catalítica de la enzima soluble estearil-ACP desaturasa (SAD), localizada en el estroma del plastidio, la mayor parte del 18:0-ACP sintetizado es eficientemente desaturado en posición Δ^9 dando lugar a oleil-ACP (18:1 ^{Δ^9} -ACP) (Ohlrogge y Browse, 1995; Li-Beisson et al., 2013). Normalmente esta desaturasa tiene mayor actividad relativa que KAS II, lo que explica la menor acumulación de 18:0 que de 16:0 en plantas (Harwood, 1996).

En plantas, las cadenas de acilo recién sintetizadas pueden incorporarse a glicerolípidos y glicerofosfolípidos mediante dos rutas diferentes, la procariótica y la eucariótica.

La ruta procariótica tiene lugar en los plastidios. En ella la síntesis de glicerolípidos ocurre mediante aciltransferasas plastidiales que utilizan los acil-ACPs sintetizados en el estroma del plastidio (Ohlrogge y Browse, 1995; Dörmann, 2005).

La ruta eucariótica se ubica en el RE, mitocondria y aparato de Golgi. En esta ruta intervienen aciltransferasas extraplastidiales que utilizan acil-CoAs exportados desde el plastidio (Harwood, 1996). La transferencia de los grupos acilos de nueva síntesis desde el plastidio al RE ocurre a través del reservorio de acil-CoAs en el citosol. Para ello, en un primer paso, las acil-ACP tioesterasas plastidiales (FAT-A para el oleato y FAT-B para los ácidos grasos saturados de acuerdo a Jones et al., 1995), hidrolizan los acil-ACPs dando lugar a ácidos grasos libres. Posteriormente, estos ácidos grasos se exportan al citoplasma, se esterifican para formar acil-CoAs mediante la acción catalítica de la acil-CoA sintetasa de ácidos grasos de cadena larga (LACS) para que puedan emplearse en reacciones biosintéticas o degradativas en distintas localizaciones de la célula (Ohlrogge y Browse, 1995; Li-Beisson et al., 2013).

Otra ruta recientemente propuesta para la transferencia de los grupos acilos al RE, implicaría que los grupos acilos recién sintetizados entren a formar parte de PC mediante la acilación de LPC en la membrana del plastidio. Con esta nueva propuesta serían estas moléculas de PC, en lugar de los acil-CoAs, las que se usarían para transferir los grupos acilos del plastidio al RE (Tjellström et al., 2012). Las propiedades de especificidad de las aciltransferasas de las dos rutas difieren entre sí, generando una distribución de sus ácidos grasos específica en cada caso. Hay que considerar que ambas rutas están íntimamente relacionadas, por cuanto el cloroplasto puede utilizar PC, LPC, DAG y PA derivados de la ruta eucariótica (Block et al., 2013).

1.3.2. BIOSÍNTESIS DE TRIACILGLICEROLES (TAG)

1.3.2.1. Ruta de Kennedy

La biosíntesis de TAG se realiza en el RE y ocurre a través de varias rutas interconectadas. Entre ellas destaca la ruta clásica de síntesis de TAG, dependiente de acil-CoA, pero también están implicadas otras reacciones catalizadas por enzimas independientes de acil-CoA y reacciones de edición de acilos. La ruta clásica de síntesis de TAG, o ruta de Kennedy, fue dilucidada por primera vez en 1961 en animales (Kennedy, 1961) e identificada posteriormente en plantas (Barron y Stumpf, 1962). Esta ruta consiste en la acilación secuencial del *sn*-glicerol-3-fosfato (G3P) usando para ello grupos acilos procedentes de un reservorio de acil-CoAs. Este reservorio se alimenta tanto de la síntesis *de novo* de ácidos grasos como de los grupos acilos liberados tras el reciclaje de fosfolípidos (Figura 9).

En la primera reacción de esta ruta, una glicerol-3-fosfato aciltransferasa (GPAT, EC 2.3.1.15) cataliza la acilación en la posición *sn*-1 de una molécula de G3P con un grupo acilo del reservorio de acil-CoAs dando lugar a LPA. En el paso siguiente, una lisofosfatidato aciltransferasa (LPAAT; EC 2.3.1.51) cataliza la transferencia de un segundo grupo acilo a la posición *sn*-2 de LPA para formar PA. La especificidad de sustrato de esta enzima varía en función de la especie. Por ejemplo, las enzimas LPAATs de colza (*Brassica napus*), girasol (*Helianthus annuus*) y lino (*Linum usitatissimum*) favorecen a oleil-, linoleil- y α -linolenil-CoA respectivamente, mientras que en otros cultivos oleaginosos, como el coco (*Cocos nucifera*) y la palma (*Elaeis guinensis*), esta actividad favorece la incorporación de ácidos grasos de cadena media como el ácido decanoico (10:0) o mirístico (14:0). El glicerofosfolípido PA es un precursor para la síntesis de otros glicerofosfolípidos, de forma que la especificidad de esta enzima también queda reflejada en la composición de estos lípidos. La tercera etapa la lleva a cabo una fosfatidato fosfatasa (PAP, EC 3.1.3.4) que hidroliza el fosfato de la posición *sn*-3 de PA dando lugar a la formación de

DAG. Por último, un tercer acil-CoA es transferido a la posición *sn*-3 del DAG mediante la acción catalítica de la acil-CoA:diacilglicerol aciltransferasa (DGAT; EC 2.3.1.20) dando lugar a TAG. Esta enzima se clonó por primera vez en ratón (Cases et al., 1998) y posteriormente en plantas (Hobbs et al., 1999; Zou et al., 1999; Bouvier-Nave et al., 2000). Se han identificado dos subfamilias de DGATs de membrana alejadas evolutivamente, DGAT1 y DGAT2 (Lardizabal et al., 2001; Shockey et al., 2006; Kroon et al., 2006; Zhang et al., 2009; Liu et al., 2012). La selectividad de sustrato de las DGATs depende de diferentes factores, como la composición de acilos del reservorio de DAG, la concentración de acil-CoAs y la temperatura (Lung y Weselake, 2006). En plantas DGAT1 parece ser la principal enzima en la acumulación de aceite de semilla, mientras que DGAT2 parece tener un papel importante en la incorporación de ácidos grasos inusuales en TAG (Burgal et al., 2008; Shockey et al., 2006; Zhou et al., 2008; Li et al., 2010). Aunque DGAT1 y DGAT2 son las principales subfamilias, se han identificado en plantas otras proteínas con actividad DGAT con secuencias completamente diferentes en las que no aparece ninguno de los residuos conservados de DAGAT1 o DAGAT2 (Saha et al., 2006; Hernández et al., 2012; Durrett et al., 2010; Rani et al., 2010; Cao, 2011).

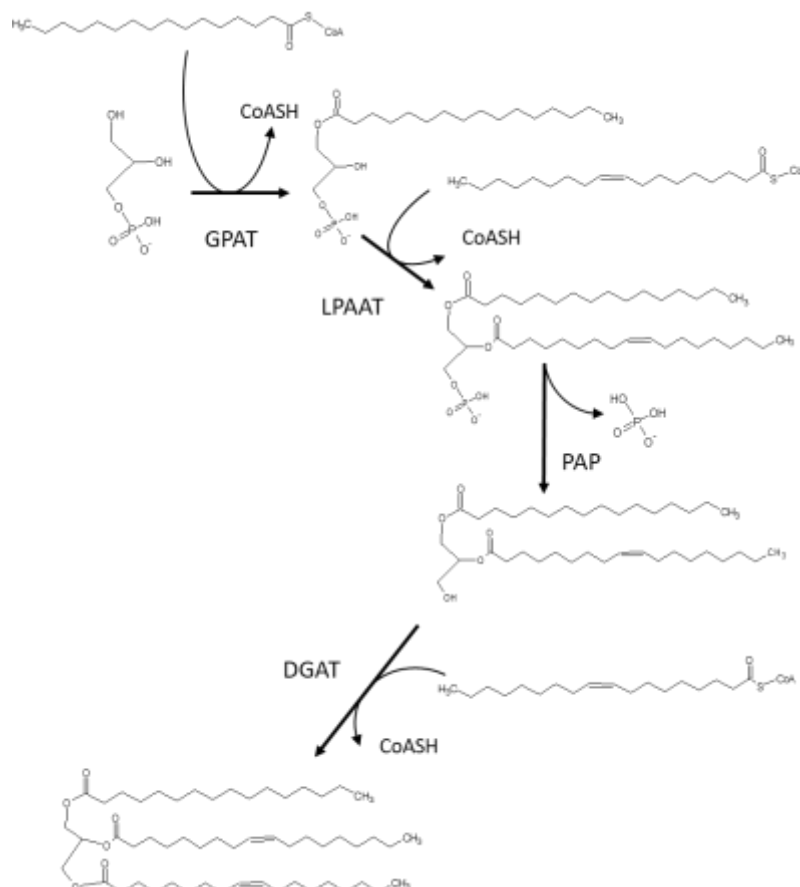


Figura 9. Esquema general de la ruta de Kennedy. GPAT: glicerol-3-fosfato:acil-CoA aciltransferasa; LPAAT: lisofosfatidato:acil-CoA aciltransferasa; PAP: fosfatidato fosfatasa; DGAT: diacilglicerol:acil-CoA aciltransferasa.

1.3.2.2. Biosíntesis de triacilgliceroles (TAG) independiente de acil-CoA

Además de la ruta de Kennedy se han identificado rutas alternativas que dan lugar a la síntesis de TAG en las que no están implicadas moléculas de acil-CoA y en las que las moléculas de PC y

DAG juegan un papel central (Beaudoin y Napier, 2004; Chapman y Ohlrogge, 2012; Li-Beisson et al., 2013).

Uno de los mecanismos independientes de acil-CoA para la obtención de TAG se basa en la transacilación de grupos acilos desde la posición *sn*-2, o en menor medida desde *sn*-1, de un fosfolípido como PC o PE a la posición *sn*-3 de DAG, dando lugar a TAG y al lisofosfolípido correspondiente (Banaś et al., 2000, 2013; Dahlqvist et al., 2000; Ståhl et al., 2004). Esta reacción la cataliza la enzima fosfolípido:diacilglicerol aciltransferasa (Figura 10; PDAT, EC 2.3.1.158), que se caracterizó por primera vez en levaduras y en preparaciones microsomales de semillas de ricino (*Ricinus communis*), *Crepis palaestina* y girasol (*Helianthus annuus*) (Dahlqvist et al., 2000). Los estudios de Dahlqvist et al. (2000) sugirieron que la PDAT podría desempeñar un papel importante en la canalización de los ácidos ricinoleico y vernólico de PC a TAG en ricino y *Crepis palaestina*, respectivamente. Posteriormente esta actividad se caracterizó en *Arabidopsis*, encontrándose que además de utilizar diferentes fosfolípidos como donadores de acilos, *At*PDAT podía aceptar grupos acilos de 10 a 22 átomos de carbono (Ståhl et al., 2004). *At*PDAT presentó la máxima actividad con grupos acilos que contenían varios enlaces dobles, grupos epoxi o hidroxilo indicando que la especificidad de PDAT por ácidos grasos inusuales no se limita exclusivamente a las plantas que los producen (Ståhl et al., 2004; Li et al., 2010). Estos resultados concuerdan con la hipótesis de que esta enzima juega un papel importante en la incorporación de ácidos grasos inusuales de fosfolípidos de membrana en TAG. Estudios posteriores, demostraron que PDAT y DGAT son las dos enzimas principales que contribuyen a la síntesis de TAG de semilla en *Arabidopsis* (Zhang et al., 2009) y *Saccharomyces cerevisiae* (Ghosal et al., 2007). La contribución relativa de estas dos enzimas a la composición final de TAG puede variar no sólo entre distintas especies de la misma familia, sino también en los diferentes estadios del desarrollo de la semilla o en las distintas fases del crecimiento celular en levadura (Banaś et al., 2013; Ghosal et al., 2007; Sandager et al., 2002; Oelkers et al., 2002; Li et al., 2010). Se ha demostrado que, al menos en *Camelina sativa*, PDAT no solo está implicada en la síntesis de TAG sino también en la respuesta a diferentes situaciones de estrés (Yuan et al., 2017).

En trabajos anteriores al descubrimiento de la actividad PDAT, realizados con mucosa intestinal de ratas (Lehner y Kuksis, 1993), con ricino (*Ricinus communis*) (Mancha y Stymne, 1997) y con cártamo (*Carthamus tinctorius*) (Stobart et al., 1997), se sugirió la existencia de otra reacción de transacilación que daba lugar a TAG. En dicha reacción, se transferían grupos acilos entre dos moléculas de DAG para generar TAG y MAG mediante una enzima que denominaron diacilglicerol:diacilglicerol transacilasa (DAGTA). Ahora, esta actividad podría ser explicada, al menos parcialmente, por la actividad enzimática PDAT (Banaś et al., 2013; Ghosal et al., 2007; Ståhl et al., 2004).

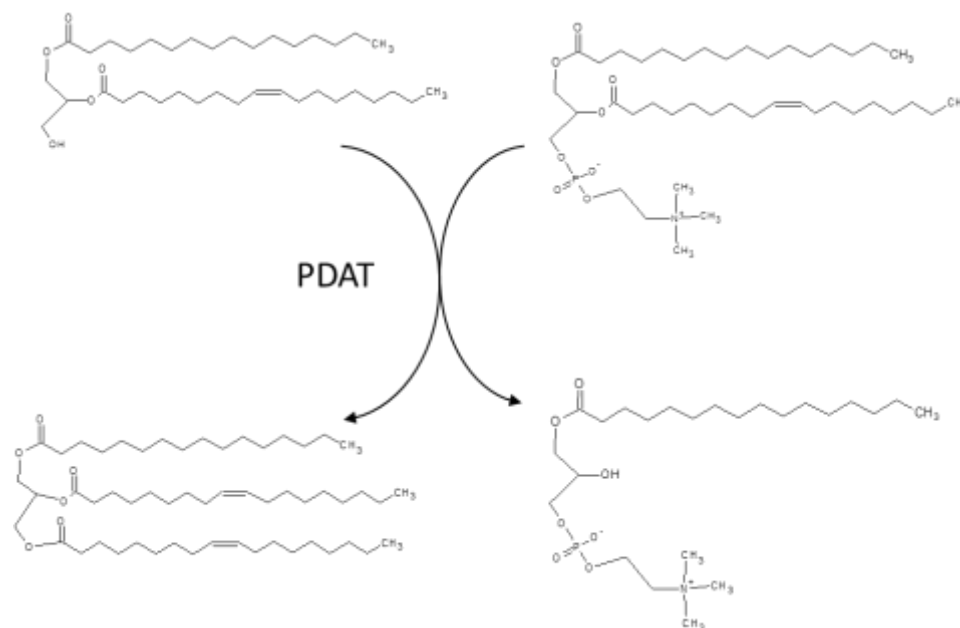


Figura 10. Reacción de acilación de diacilgliceroles por acción de la enzima fosfolípido:diacilglicerol aciltransferasa (PDAT).

Para tener una visión global de la síntesis de TAG en plantas hay que considerar que las moléculas inmediatamente precursoras de TAG son DAG y que estas constituyen un punto de bifurcación de rutas. Además de estar implicadas en la síntesis de TAG mediante la ruta de Kennedy explicada en el apartado anterior o mediante la acción catalítica de PDAT explicada en este apartado, estas moléculas están implicadas en la síntesis de PC, que también es una molécula clave en la síntesis de TAG. En las reacciones de síntesis de PC a través de DAG, intervienen la diacilglicerol colina fosfotransferasa (DAG-CPT EC 2.7.8.2) (Slack et al., 1983; Kinney y Moore, 1987; Stobart y Stymne, 1985; Vogel y Browse, 1996) que cataliza la condensación de CDP-colina y DAG y la fosfatidilcolina:diacilglicerol colinafosfotransferasa (PDCT) que cataliza la reacción de interconversión entre PC y DAG por transferencia del grupo fosfocolina (Lu et al., 2009). Si bien, durante esta última reacción no se da una síntesis neta de PC, sí se produce una molécula de PC con una composición de acilo diferente a la original.

La PC es una molécula clave en la síntesis de TAG porque los ácidos grasos esterificados en su posición *sn*-2 son susceptibles de experimentar distintas modificaciones, como desaturaciones, hidroxilaciones, epoxidaciones y otras reacciones que dan lugar a ácidos grasos inusuales (Hills y Roscoe, 2006; Bates y Browse, 2011, 2012). Por ejemplo, en el RE de plantas superiores existen desaturasas de ácidos grasos dependientes de nicotinamida adenina dinucleótido reducida (NADH), FADs (*Fatty Acid Desaturases*), que actúan sobre los ácidos grasos esterificados en PC dando lugar a PUFA (Sperling et al., 1993; Stymne y Appelqvist, 1978; Shamsi et al., 2012; Bates y Browse, 2012). Así, el oleico esterificado en posición *sn*-2 de PC puede ser desaturado a ácido linoleico ($18:2^{\Delta 9c,12c}$) y posteriormente a α -linolénico ($18:3^{\Delta 9c,12c,15c}$), mediante reacciones catalizadas por la oleato desaturasa (FAD2) (Okuley et al., 1994) y la linoleato desaturasa (FAD3) (Arondel et al., 1992), respectivamente. Otras desaturasas, como la $\Delta 6$ desaturasa de las boragináceas y de otras familias de plantas, introducen dobles enlaces en posiciones inusuales y generan γ -linolénico ($18:3^{\Delta 6c,9c,12c}$) (Sayanova, 1997; Eckert et al., 2006). Otras modificaciones de ácidos grasos que se producen en PC son catalizadas por enzimas relacionadas evolutivamente con las desaturasas, como la oleil hidroxilasa de *Ricinus communis* (RcFAH12), que introduce un grupo hidroxilo en la posición $\Delta 12$ del ácido oleico dando lugar a ricinoleico ($12\text{-OH } 18:1^{\Delta 9c}$) (Moreau y Stumpf, 1981; Bafor et al., 1991; Van de Loo et al., 1995), la epoxigenasa de *Crepis palaestina*, que introduce un grupo epoxi o la acetilnasa de *Crepis alpina*, que introduce un tripe enlace (Lee, 1998; Napier, 2007).

Una vez se han modificado los ácidos grasos esterificados a PC estos pueden volver al reservorio de DAG mediante la acción catalítica de la DAG-CPT (Slack et al., 1983) o de la PDCT (Lu et al., 2009). Las plantas pueden usar para la síntesis de TAG tanto estos DAG enriquecidos con ácidos grasos modificados como DAG de nueva síntesis (Bates y Browse, 2011 y 2012; Bates et al., 2009 y 2012). El reservorio principal de DAG usado para la síntesis de TAG varía en función de la planta. Así, mientras que en soja (*Glycine max*), cártamo (*Carthamus tinctorius*) y *Arabidopsis thaliana*, la mayoría de los TAG formados se sintetizan a partir de DAG derivado de PC, en otras especies como el cacao (*Theobroma cacao*) y cilantro (*Coriandrum sativum*), parecen formarse mayoritariamente a partir de DAG sintetizado *de novo* (Bates et al., 2009; Bates y Browse, 2012).

1.3.3. MECANISMOS DE EDICIÓN DE ACILOS

Las aciltransferasas dependientes de acil-CoA usan para la biosíntesis de glicerofosfolípidos y TAG un reservorio de acil-CoAs que se nutre de dos flujos diferentes de ácidos grasos:

- En una primera ruta, explicada en el apartado 3.1 de la introducción, los acil-CoAs se forman mediante la acción catalítica de la LACS, gracias a la cual los ácidos grasos recién sintetizados en el cloroplasto son esterificados con CoA y exportados fuera del plastidio (Ohlrogge y Browse, 1995). Mediante esta ruta, el reservorio de acil-CoAs se enriquece con ácidos grasos saturados y monoinsaturados.
- En una segunda ruta, se intercambian grupos acilos entre el reservorio de acil-CoAs y los fosfolípidos a través de un mecanismo de edición de acilos conocido como ciclo de Lands (Lands, 1965), que proporciona al reservorio de acil-CoAs una variedad de ácidos grasos modificados a través de reacciones sobre PC. Los ácidos grasos modificados que se generen dependerán de la especie vegetal.

El ciclo de Lands, tal y como se describió inicialmente, implica la hidrólisis del ácido graso en posición *sn-2* o *sn-1* de PC para formar LPC mediante la actividad fosfolipasa A2 (Figura 11; PLA2, EC 3.1.1.4) y la posterior reacilación de LPC usando acil-CoA como donador de acilo, mediante la reacción directa de la lisofosfatidilcolina aciltransferasa (LPCAT, EC 2.3.1.23). Para que los ácidos grasos libres que se forman tras la acción catalítica de PLA2 se activen a acil-CoA, se requiere la acción de la LACS (Figura 11; Das et al., 2001). Un mecanismo más eficiente para la transferencia directa de ácidos grasos desde PC al reservorio de acil-CoAs consiste en la reacción inversa de la LPCAT, aunque esta reacción es termodinámicamente bastante menos favorable que la reacción directa (Stymne y Stobart, 1984; Bates et al., 2007, 2012; Lager et al., 2013; Jasieniecka-Gazarkiewicz et al., 2016). Así, con este ciclo se da una rápida desacilación y reacilación de PC sin síntesis o degradación neta, permitiendo un intercambio permanente de grupos acilos entre PC y acil-CoAs (Li-Beisson et al., 2013; Bates et al., 2007, 2009; Bafor et al., 1991; Banaś et al., 1992). Debido a estos intercambios y a las modificaciones que sufren los ácidos grasos en PC, principal fosfolípido de las membranas vegetales, con este ciclo se determinan también ciertas propiedades de las membranas celulares (Furukawa-Stoffer et al., 2003).

Además de las actividades implicadas en el ciclo de Lands, recientemente, se ha descubierto en levaduras (Stålgerg et al., 2008) y en plantas (Lager et al., 2015; Głab et al., 2016) una actividad que podría contribuir también a la edición de acilos, la glicerofosfolcolina aciltransferasa (GPCAT, EC 2.3.1.B36). Esta actividad cataliza la síntesis de LPC mediante la acilación de L- α -glicerilfosforilcolina (L- α -GPC) usando como donadores de acilo tanto acil-CoA como LPC o lisofosfatidiletanolamina (LPE).

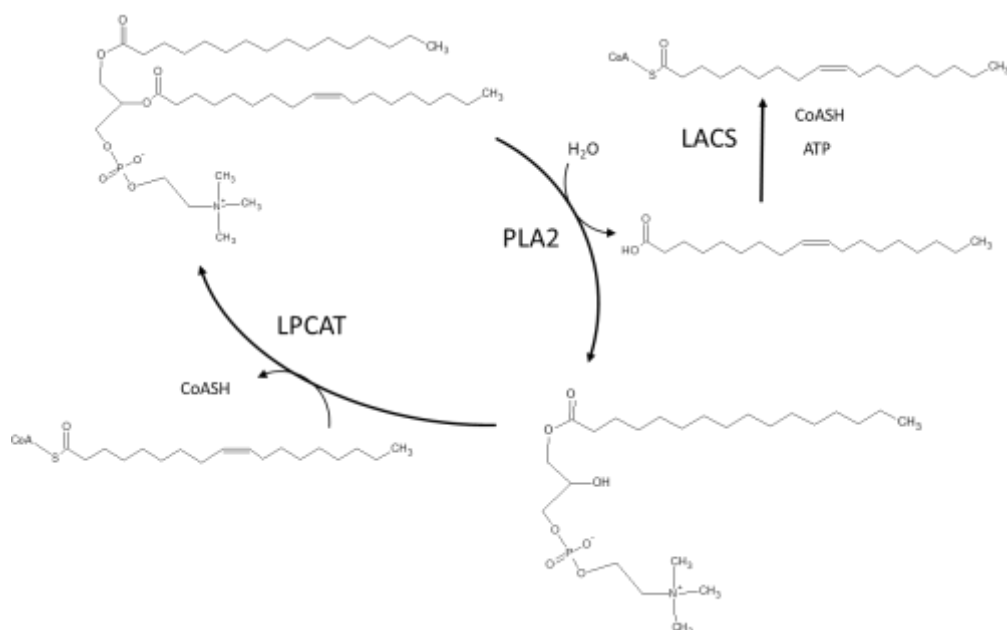


Figura 11. Esquema del intercambio de acilos a través del ciclo de Lands. PLA2: fosfolipasa A2; LPCAT: lisofosfatidilcolina aciltransferasa; LACS: acil-CoA sintetasa de ácidos grasos de cadena larga.

Gracias a esta actividad, diferentes grupos acilos pueden insertarse en la posición *sn*-1 de LPC y posteriormente pasar a formar parte de la posición *sn*-1 de PC mediante la reacción catalizada por la LPCAT (Lager et al., 2015; Głęb et al., 2016). Otra ruta que podría seguir la molécula de LPC así sintetizada sería la transacilación con otra molécula de LPC creando PC y L- α -GPC, reacción catalizada por la lisofosfatidilcolina transacilasa (LPCT) (Lager et al., 2015). Así, la acción combinada de estas dos nuevas actividades, GPCAT y LPCT, proporciona una nueva ruta de resíntesis de PC tras de su desacilación (Lager et al., 2015).

1.4. LISOFOSFATIDILCOLINA ACILTRANSFERASA (LPCAT)

Como ya se indicó en el apartado anterior, la enzima lisofosfatidilcolina aciltransferasa (LPCAT, EC 2.3.1.23) cataliza la acilación de LPC usando acil-CoA como donador de acilo y está implicada, junto con PLA2 (EC 3.1.1.4), en el mecanismo de edición de acilos conocido como ciclo de Lands (Lands, 1965). Mediante este mecanismo se intercambian los grupos acilos que se encuentran en posición *sn*-2, y en menor medida en *sn*-1, de PC con los grupos acilos del reservorio de acil-CoAs. Gracias a este ciclo entran a formar parte del reservorio de acil-CoAs ácidos grasos modificados, ya que la molécula de PC es sustrato de enzimas que los modifican, como epoxidasas, hidroxilasas, desaturasas, etc.

Ya en 1981, Stymne y Glad trabajando con preparaciones microsomales de soja (*Glycine max*) demostraron que existía un intercambio de acilo entre PC y el reservorio de acil-CoAs (Stymne y Glad, 1981). Tres años más tarde, se publicó un trabajo con preparaciones microsomales de semilla cártamo (*Carthamus tinctorius*) que sugería que este intercambio estaría catalizado por las reacciones directa e inversa de una LPCAT, sin el concurso de ninguna PLA2 ni de ninguna LACS (Figura 12; Stymne y Stobart, 1984). Posteriormente, esta actividad fue detectada en extractos mitocondriales de patata (*Solanum tuberosum*) (Testet et al., 1996) y en el RE (Larsson et al., 2007) y membranas externas de cloroplastos de Arabidopsis (Tjellstrom et al., 2012).

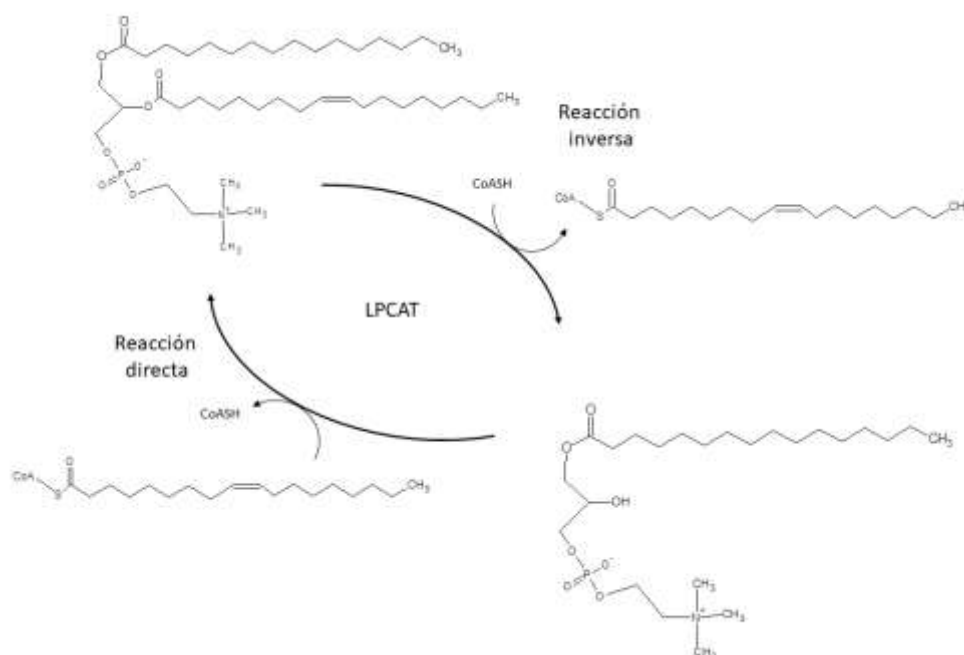


Figura 12. Esquema del intercambio de acilos a través de la acción de la enzima lisofosfatidilcolina aciltransferasa (LPCAT) en sus reacciones directa e inversa.

A pesar de la importancia de esta actividad, no ha sido hasta hace poco que las enzimas correspondientes han sido clonadas y caracterizadas. Al igual que ocurre con otras lisofosfolípido aciltransferasas (LPLATs), se han identificado enzimas LPCATs tanto de la familia 1-acilglicerol-3-fosfato-*O*-aciltransferasa (AGPAT) como de la familia *O*-aciltransferasas de unión a membrana (MBOAT) (Shindou et al., 2009). Miembros de la familia AGPAT catalizan la incorporación de un grupo acilo proveniente de un acil-CoA o acil-ACP en aceptores tales como G3P, dihidroxiacetona fosfato (DHAP) o distintos lisofosfolípidos (Shindou et al., 2009; Arroyo-Caro et al., 2013).

Pertencientes a esta familia se encontraron dos LPCATs de mamífero, LPCAT1 (Nakanishi et al., 2006; Chen et al., 2006) y LPCAT2 (Shindou et al., 2007). LPCAT1 es una enzima de expresión constitutiva, con función en la fisiología respiratoria y LPCAT2 es una enzima inducible por infección bacteriana, de importancia crítica en la homeostasis de las células inflamatorias. Ambas presentan motivos conservados descritos para las enzimas LPLATs, varios dominios putativos de transmembrana y en los extremos C-terminales la secuencia KKXX de localización en el RE (Nakanishi et al., 2006; Chen et al., 2006; Shindou et al., 2007). Estudios con LPCAT1 de ratón mostraron que además de poseer actividad LPCAT esta enzima presentaba también actividad lisofosfatidilglicerol aciltransferasa (LPGAT, EC 2.3.1.22) (Nakanishi et al., 2006) y actividad acetiltransferasa (Harayama et al., 2008). La actividad acetiltransferasa fue mayor con lisofosfolípidos (aceptores de acetilo) cuya posición *sn*-1 estaba ocupada por ácidos grasos de 16 carbonos que con los homólogos de 18 carbonos (Harayama et al., 2008). En estudios con LPCAT1 de rata en los que se ensayó la actividad aciltransferasa con distintos lisofosfolípidos, esta enzima mostró además de actividad LPCAT, cierta actividad LPGAT y LPAAT y no mostró actividad significativa ni con LPE, ni con lisofosfatidilinositol (LPI), ni con lisofosfatidilserina (LPS) (Chen et al., 2006).

Al igual que LPCAT1, la enzima LPCAT2 de ratón también presentó, además de actividad LPCAT, una significativa actividad acetiltransferasa que era mayor con lisofosfolípidos cuya

posición *sn*-1 estaba ocupada por ácidos grasos de 16 carbonos que con los homólogos de 18 carbonos (Shindou et al., 2007). En cuanto a su actividad LPCAT, esta enzima presentó mayor actividad con araquidonil-CoA (20:4^{Δ5c,8c,11c,14c}-CoA) que con acil-CoAs de cadena media usando liso-PAF (1-*O*-alquil-2-liso-*sn*-glicero-3-fosfocolina, *lyso-platelet-activating factor*) como aceptor (Shindou et al., 2007).

En 2008 se identificó en humanos otra enzima perteneciente a la familia AGPAT, LPEAT2, que presentó actividad aciltransferasa frente a LPC; si bien, su actividad LPCAT era relativamente débil en comparación con la actividad encontrada con otros lisofosfolípidos (Cao et al., 2008). En base a la similitud de secuencia con LPCAT1 de mamífero se identificaron dos proteínas homólogas en Arabidopsis, *AtLPEAT1* (At1g80950) y *AtLPEAT2* (At2g45670). Ambas mostraron una amplia especificidad de aceptor de acilo, entre ellos LPC, pero con preferencia por LPE y en concreto por 18:1-LPE en comparación con 16:0-LPE. En cuanto al donador de acilos ambas mostraron preferencia por 16:0-CoA en ensayos con 18:1-LPE como aceptor (Ståhlberg et al., 2009).

En el 2007 cinco laboratorios independientes identificaron en *Saccharomyces cerevisiae* la primera LPCAT perteneciente a la familia MBOAT, que estaba codificada por el gen YOR175c (también denominado LCA1, SCL4, LPT1 o ALE1) (Benghezal et al., 2007; Chen et al., 2007; Jain et al., 2007; Riekhof et al., 2007; Tamaki et al., 2007). Esta enzima presentaba una amplia especificidad de aceptor de acilo, entre los que se incluían LPA, LPC, LPE, LPI, LPS y lisofosfatidilglicerol (LPG), mostrando también actividad con lisofosfolípidos que no se encuentra de forma natural como el liso-PAF. En cuanto a la especificidad de acil-CoA, esta enzima fue capaz de aceptar dadores de acilo que contenían desde 2 a 20 átomos de carbono, mostrando preferencia por acil-CoA insaturados de 16 a 20 carbonos (Benghezal et al., 2007; Chen et al., 2007; Jain et al., 2007; Riekhof et al., 2007; Tamaki et al., 2007). Este descubrimiento facilitó el camino para la identificación de dos enzimas homólogas en mamíferos pertenecientes a la familia MBOAT, LPCAT3 y LPCAT4 (Hishikawa et al., 2008; Kazachkov et al., 2008; Zhao et al., 2008; Jain et al., 2009; Matsuda et al., 2008; Gijón et al., 2008). Ambas pueden catalizar la acilación de diferentes lisofosfolípidos. LPCAT3, tanto de ratón como de humano, es capaz de catalizar la acilación de LPC, LPS y LPE, mostrando una clara preferencia por LPC. Si bien en un estudio realizado por Zhao et al. (2008) no se detectó actividad LPEAT, son numerosos los estudios que sí la detectaron (Hishikawa et al., 2008; Kazachkov et al., 2008; Jain et al., 2009; Matsuda et al., 2008; Gijón et al., 2008). Mientras que LPCAT3 muestra mayor actividad con acil-CoAs de ácidos grasos poliinsaturados, 20:4^{Δ5c,8c,11c,14c}-CoA y 18:2^{Δ9c,12c}-CoA (Zhao et al., 2008; Gijón et al., 2008; Hishikawa et al., 2008; Kazachkov et al., 2008), LPCAT4 que sólo posee actividad LPCAT y LPEAT, muestra una clara preferencia por 18:1^{Δ9c}-CoA (Hishikawa et al., 2008).

También se han clonado e identificado homólogos en plantas pertenecientes a la familia MBOAT. Las primeras LPCAT clonadas en plantas pertenecientes a esta familia fueron las de Arabidopsis, *AtLPCAT1* (Atlg12640) y *AtLPCAT2* (Atg63050) (Ståhl et al., 2008). Al igual que ocurre con otras enzimas LPCATs, además de catalizar la reacción usando LPC como aceptor de acilo presentan afinidad, aunque menor, por otros aceptores como LPS, LPE y LPG (Ståhl et al., 2008). Estudios con dobles mutantes de estos genes en Arabidopsis, mostraron un impacto moderado en la composición de TAG de semilla en comparación con las plantas silvestres, detectándose una disminución de PUFA y un aumento de 20:1^{Δ11c}. Esto podría explicarse por una disminución del flujo de 18:1 hacia PC para su desaturación y una mayor disponibilidad del mismo para su elongación (Wang et al., 2012; Bates et al., 2012). La mutación de estos genes mostró un claro impacto sobre el perfil de acil-CoA, confirmando la hipótesis ya propuesta por Stymne sobre la relación entre el reciclaje de PC y el reservorio de acil-CoAs (Stymne et al., 1983; Wang et al., 2012). El análisis del perfil de acil-CoA reveló alteraciones metabólicas complicadas; con un incremento de 18:1^{Δ9c} y 20:1^{Δ11c} y una disminución de 16:0. Además, un estudio en semillas de Arabidopsis con un triple mutante *rod1/lpcat1/lpcat2* sugirió que en conjunto, la edición de acilos y la interconversión de PC y DAG mediada por PDCT, proporcionan cerca de dos tercios del flujo de PUFA desde PC a TAG en esta planta (Bates et al.,

2012). La aplicación de la actividad LPCAT en la biosíntesis de TAG quedó confirmada mediante estudios *in vitro* e *in vivo* en un mutante *dgat1* de *Arabidopsis*. En estos estudios observaron que la actividad LPCAT se veía aumentada en el mutante *dgat1* en comparación con las plantas silvestres y que este aumento de actividad era el principal responsable de la síntesis de TAG mediada por PDAT (Xu et al., 2012). Mientras que las plantas *dgat1* mostraron una disminución moderada en el contenido de TAG, en el doble *knockout* con LPCAT2 se observó una fuerte reducción, hecho que podía explicarse mediante una deficiencia para reaclilar LPC y la reducción asociada del suministro de PC para la reacción de síntesis de TAG catalizada por PDAT (Xu et al., 2012).

En base a las secuencias aminoacídicas de *Arabidopsis* se identificaron en *Brassica napus* tres LPCATs homólogas pertenecientes a la familia MBOAT, *BnLPCAT1-1*, *BnLPCAT1-2* y *BnLPCAT2*; siendo las dos primeras ortólogos de *AtLPCAT1* y la última de *AtLPCAT2* (Zheng et al., 2012). *BnLPCAT1-1* y *BnLPCAT2* se expresaban de forma constitutiva y ubicua en los distintos órganos de la planta, presentaban una alta especificidad por acil-CoAs insaturados y mostraban preferencia por LPC, aunque también eran capaces de usar liso-PAF como aceptor de acilo (Zheng et al., 2012). Zheng et al. (2012), en base a estudios anteriores realizados por Chen et al. (2007), describieron además una técnica muy útil que permite la identificación de genes *LPCAT*. Esta técnica está basada en la complementación de la actividad aciltransferasa por expresión heteróloga de los genes putativos en un mutante de levadura, denominado Y02431, *ale1*, *lca1Δ* o *slc4*, que es hipersensible al liso-PAF.

En 2013 se caracterizó en *Ricinus communis* una LPCAT que mostró una clara preferencia por 18:1-CoA en comparación con el ácido graso inusual 18:1-OH-CoA (ricinoleil-CoA) (Arroyo-Caro et al., 2013). Este resultado estaba en concordancia con el hecho de que este último ácido graso se encuentra principalmente en TAG de semilla, donde supone hasta un 90% del total de ácidos grasos (Moreau y Stumpf, 1981; McKeon et al., 1999; Bafor et al., 1991; Van De Loo et al., 1995), quedando excluido de los fosfolípidos de membrana (Stahl et al., 1995). Es decir, la poca presencia de este ácido graso en los fosfolípidos de membrana se puede explicar en parte mediante la reacción LPCAT, ya que esta enzima no toma este ácido graso del reservorio de acil-CoAs para su reincorporación en PC. Estos resultados coinciden además con estudios previos realizados con ácidos grasos (Lin et al., 2002) o acil-CoAs (Bafor et al., 1991) marcados en microsomas de semillas, donde la monitorización de la formación de PC indicó una pobre incorporación de 18:1-OH en PC en relación con otros ácidos grasos, en particular con 18:1. Análisis de especificidad de sustrato aceptor de acilo indicaron que esta enzima además de acilar LPC también era capaz de acilar liso-PAF, mostrando incluso mayor actividad frente este compuesto, cuyo grupo acilo está unido por un enlace éter, que la mostrada con otros lisofosfolípidos con el grupo acilo unido por enlace éster, como LPE o LPA (Arroyo-Caro et al., 2013).

Una vez identificados los genes *LPCATs* de distintas plantas, la capacidad de esta enzima para catalizar su reacción inversa, que ya había sido demostrada mediante ensayos *in vitro* en microsomas aislados de tejidos vegetales y animales (Stymne y Stobart, 1984), fue confirmada con microsomas de levadura que los sobreexpresaban (Lager et al., 2013; Pan et al., 2015; Jasieniecka-Gazarkiewicz et al., 2016). Lager et al., usando preparaciones microsomales, confirmaron mediante ensayos *in vitro* que *LPCATs* de distintas plantas podían catalizar un intercambio de acilo mediante su reacción directa e inversa y además observaron que la selectividad de acilo en ambas direcciones podría ser diferente (Lager et al., 2013). *LPCATs* de 5 plantas de diferentes especies incorporaban grupos acilos en la posición *sn-1* y *sn-2* de LPC con preferencia por ácidos grasos insaturados de 18 carbonos que por ricinoleico mientras que en la reacción inversa estas enzimas prefirieron *sn-1*-palmitil-*sn-2*-ricinoleil-PC que *sn-1*-palmitil-*sn-2*-oleil-PC (Lager et al., 2013). Esto puede explicarse porque en la reacción directa los grupos acilos se encuentran formando parte de una molécula soluble mientras que en la reacción inversa estos se encuentran en un lípido de membrana, haciendo que la presentación del grupo acilo sea muy diferente para cada caso (Lager et al., 2013; Jasieniecka-Gazarkiewicz et al., 2016).

Hay que destacar que la alta especificidad con ácidos grasos hidroxilados en la reacción inversa de la LPCAT puede evitar efectos adversos sobre las membranas de estas plantas al eliminar los ácidos grasos oxidados de los lípidos de la membrana (Bates, 2016; Lager et al., 2013). Además de poseer especificidades de acilo diferente estas enzimas también pueden presentar una especificidad de lípido diferente en ambas direcciones.

Otra de las investigaciones que evidenciaron la capacidad de esta enzima para operar de forma reversible fueron las realizadas por Pan et al. (2015) con un mutante de levadura sin capacidad de síntesis de TAG y con una actividad LPCAT extremadamente baja. En sus estudios *in vivo* demostraron que la coexpresión de FAD2, FAD3, DGAT1-1 y LPCAT1 de lino (*Linum usitatissimum*) en este mutante de levadura hacía aumentar significativamente el nivel de PUFA en TAG a la vez que disminuía en los fosfolípidos, en comparación con los niveles obtenidos al expresar únicamente las desaturasas y DGAT1-1. Una explicación razonable para este resultado era que los grupos acilos poliinsaturados formados en PC estuvieran pasando al reservorio de acil-CoAs mediante la reacción inversa de la LPCAT, haciendo que éstos estuvieran disponibles para la síntesis de TAG mediada por DGAT.

En 2015 se identificaron dos genes en *Nicotiana benthamiana* con actividad LPCAT, *NbLPCAT1* y *NbLPCAT2* (Zhang et al., 2015). Mientras *NbLPCAT1* presentó preferencia por LPC frente a otros lisofosfolípidos, *NbLPCAT2* mostró ser una LPAAT con cierta actividad LPCAT. A diferencia de otras LPCATs de plantas estudiadas previamente, como la de *Ricinus communis* cuyo máximo nivel de expresión se encontró en semillas en desarrollo (Arroyo-Caro et al., 2013) o la *LPCAT1-1* de *Brassica napus* cuyo nivel de expresión más alto se encontró en plántulas de una semana (Zheng et al., 2012), el máximo nivel de expresión de los genes *LPCATs* de *Nicotiana benthamiana* se encontró en flores (Zhang et al., 2015). Estas diferencias en los niveles de expresión en distintos tejidos de los genes *LPCATs* sugiere que estos podrían tener distintas funciones en el desarrollo de plantas y en el metabolismo de lípidos (Zhang et al., 2015).

En conjunto todos los estudios coinciden en que la actividad LPCAT es necesaria para la acilación de LPC en el ciclo de edición de acilos y en que está implicada además en la desacilación de PC, desempeñando un importante papel en la determinación de la composición de ácidos grasos de lípidos de membrana y de TAG. Como los estudios en *Arabidopsis* mostraron que PDCT y LPCAT son las principales enzimas que controlan el flujo de ácidos grasos a través de PC (Bates et al., 2012) y es en esta molécula donde los ácidos grasos experimentan modificaciones, es de esperar, que el conocimiento de ambas enzimas pueda ser de gran utilidad a la hora de diseñar un aceite vegetal con un perfil lipídico adaptado a distintas aplicaciones.

1.5. FOSFATIDILCOLINA:DIACILGLICEROL COLINAFOSFOTRANSFERASA (PDCT)

La enzima fosfatidilcolina:diacilglicerol colinafosfotransferasa (PDCT) cataliza la interconversión entre DAG y PC mediante el intercambio del grupo fosfocolina, generando nuevas moléculas de PC y de DAG (Figura 13).

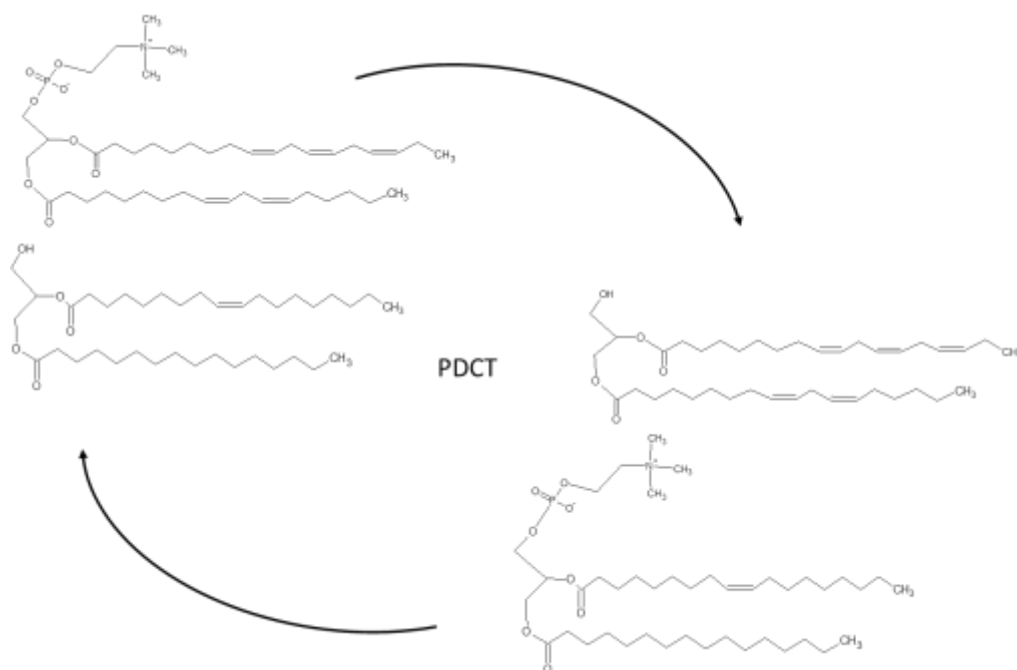


Figura 13. Reacción de intercambio de grupos fosfocolinas por acción de la enzima fosfatidilcolina:diacilglicerol colinafosfotransferasa (PDCT).

La primera PDCT descrita fue la de *Arabidopsis thaliana*, que es codificada por el gen *ROD1* (*Reduced Oleate Desaturation 1*) (Lu et al., 2009). Esta proteína fue identificada analizando una serie de mutantes de *Arabidopsis* entre los que destacó uno, que denominaron *rod1*, que presentaba una disminución del 40% en el nivel de PUFA en TAG y un aumento de estos ácidos grasos en PC, en comparación con los niveles encontrados en las plantas silvestres. Como ya era conocido que los ácidos grasos insaturados se sintetizaban en PC mediante reacciones catalizadas por las enzimas desaturasas de ácidos grasos FAD2 y FAD3 (Wallis y Browse, 2002), estos resultados sugerían que la mutación *rod1* podría estar produciendo una disminución de la transferencia de 18:1 a la molécula de PC para su desaturación. Tras obtener la secuencia aminoacídica de esta nueva proteína, se observó que presentaba cierta homología con la proteína fosfatidil:ceramida colinafosfotransferasa (SMS, EC 2.7.8.27) de mamíferos, que cataliza la transferencia del grupo fosfocolina desde PC a ceramida. Las plantas no contienen ceramida, pero la estructura de esta molécula es similar a la del DAG, lo cual constituía una prueba que indicaba que *ROD1* podría catalizar la transferencia del grupo fosfocolina de PC al DAG. Esta hipótesis terminó por confirmarse mediante diferentes ensayos de actividad, que indicaron que sólo el grupo fosfocolina en PC era accesible para esta nueva enzima. Esta proteína se clasificó dentro de la familia fosfatasa/fosfotransferasa de lípidos (LPT, *lipid phosphatase/phosphotransferase*) al encontrarse en su secuencia los dominios C2 (SGH) y C3 (SRXXXXXHXXXD) característicos de esta familia (Sigal et al., 2005). Además, mediante programas de predicción topológica se identificó como una proteína integral de membrana.

De los estudios anteriores se deducía que PDCT podía tener un papel importante canalizando hacia TAG los ácidos grasos hidroxilados (HFA, *Hydroxylated Fatty Acids*) generados en PC, a través de la síntesis de la molécula precursora DAG. Para probar esta hipótesis se expresó en el mutante *rod1* de *Arabidopsis* y en plantas silvestres la hidroxilasa de ricino (*RcFAH12*), que cataliza la introducción de un grupo hidroxilo en el ácido oleico esterificado en PC. Los resultados de este estudio mostraron que el mutante *rod1* expresando *RcFAH12* presentaba una fuerte disminución de HFA en TAG en comparación con la planta silvestre expresando *RcFAH12*. Además, se puso de manifiesto que la actividad PDCT era necesaria para conseguir un

metabolismo eficiente de estos ácidos grasos en las semillas transgénicas de *Arabidopsis* (Hu et al., 2012).

Posteriormente, en base a la secuencia ya conocida de *AtROD1*, se identificó una enzima homóloga en ricino (*Ricinus communis*), que al expresarse en el mutante de *Arabidopsis rod1* era capaz de recuperar la composición de ácidos grasos en semilla de la planta silvestre (Hu et al., 2012). Mediante ensayos de actividad se observó que tanto *RcROD1* como *AtROD1* presentaban mayor actividad PDCT con PC de soja (*Glycine max*), que posee un alto contenido en 18:2, que *sn-1-ricinoleil-sn-2-ricinoleil-PC* y que, en ambos casos, *RcROD1* presentaba mayor actividad que *AtROD1* (Hu et al., 2012). Con el fin de demostrar que *RcROD1* era capaz de incrementar la acumulación de HFA, este gen se coexpresó con *RcFAH12*, tanto en el mutante *rod1* como en la planta silvestre. En este estudio se encontró que el mutante *rod1* expresando *RcROD1* y *RcFAH12* tenía unos niveles de HFA parecidos a los de la planta silvestre expresando sólo *RcFAH12*, mientras que en la planta silvestre expresando ambas enzimas los niveles de HFA encontrados fueron aproximadamente el doble que los encontrados en la planta silvestre expresando sólo *RcFAH12*. Analizando las distintas especies moleculares de TAG y las composiciones de ácidos grasos de TAG y de PC durante el desarrollo de las semillas de *Arabidopsis*, llegaron a la conclusión de que la actividad PDCT canalizaba los HFA de PC a DAG, incrementando así el contenido de estos ácidos grasos en TAG. Otra característica clave observada para esta enzima fue que conseguía recuperar parcialmente el bajo contenido en aceite de las semillas que expresaban *RcFAH12* (Hu et al., 2012).

Una investigación reciente en *Arabidopsis* mostró que la acción combinada de PDCT y LPCATs es responsable de la canalización hacia TAG de cerca de dos tercios de PUFA en esta especie. En este estudio se observó que en el triple mutante *rod1/lpcat1/lpcat2* se obtenía una pronunciada disminución de PUFA en TAG de semilla en comparación con las plantas silvestres y que esta disminución era mucho mayor que la que se obtenía en el doble mutante *lpcat1/lpcat2* o en el mutante *rod1*; sugiriéndose que la edición de acilos y la acción catalítica de PDCT constituyen las vías principales de suministro de ácidos grasos modificados en PC para la síntesis de TAG (Wickramarathna et al., 2015; Bates et al., 2012; Lager et al., 2013).

Poco después, se aislaron y caracterizaron dos genes *PDCT* de lino (*Linum usitatissimum*), *LuPDCT1* y *LuPDCT2*, que mostraron una alta expresión en embriones en desarrollo (Wickramarathna et al., 2015). En estudios de complementación con el mutante de *Arabidopsis rod1* estas enzimas fueron capaces de restaurar los niveles de PUFA en la planta. Además, cuando se coexpresaron en *Saccharomyces cerevisiae* junto con las desaturasas de ácidos grasos, *FAD2* y *FAD3*, se observó un aumento del nivel de PUFA (Wickramarathna et al., 2015).

En conjunto, todos estos resultados evidencian que PDCT desempeña un papel crucial en la determinación del perfil de ácidos grasos en los lípidos de semilla, ya que su acción catalítica permite que los grupos acilos esterificados en DAG de nueva síntesis pasen a formar parte de PC, donde estos pueden sufrir posteriores modificaciones (hidroxilaciones, desaturaciones, epoxidaciones, etc.). Además, parece ser que la mayoría de los ácidos grasos modificados en PC vuelven a DAG gracias también a la actividad PDCT (Lu et al., 2009; Hu et al., 2012; Bates y Browse, 2012). Así, gracias a la acción catalítica de PDCT se genera un reservorio de DAG derivado de PC que puede ser usado para la síntesis de TAG y que tiene una composición de acilo diferente a la del reservorio de DAG *de novo* (Bates, 2016).

Es importante tener en cuenta que los TAG ricos en ácidos grasos modificados pueden producirse no sólo mediante la síntesis de DAG derivado de PC si no también mediante la síntesis de DAG *de novo* combinada con la edición de acilos. En la actualidad solo se tiene información sobre la contribución relativa de cada una de estas vías a la síntesis de TAG para algunas plantas (Bates, 2016; Bates y Browse, 2012). Por ejemplo, en soja se llevaron a cabo estudios en embriones en desarrollo que mostraron que el reservorio de DAG *de novo* tenía una composición de acilo diferente y era cinéticamente distinto del reservorio de DAG utilizado para la síntesis de

TAG y que la composición de acilo de los TAG era más parecida a la composición de acilo de PC que a la composición de los DAG *de novo*. Además de esto, observaron que al añadir [¹⁴C]-glicerol, el flujo principal de esta molécula no fue hacia la síntesis de TAG mediante la ruta de Kennedy sino hacia PC. Juntos, estos resultados sugirieron que al menos en soja, la síntesis de TAG ocurre principalmente mediante el uso de DAG derivado de PC (Bates, 2016; Bates y Browse, 2012; Bates et al., 2009).

Tras casi una década de estudio sobre esta enzima queda claro que se trata de una proteína clave en la ruta de síntesis de TAG en plantas y todo apunta a que puede ser útil en el campo de la bioingeniería de cultivos de especies oleaginosas, pudiendo usarse para aumentar los niveles de PUFA, lo cual tendría numerosas aplicaciones en la alimentación humana y de animales, en la producción de suplementos nutricionales y en la producción de bioproductos industriales (Wickramarathna et al., 2015). Por ello y por el número limitado de trabajos publicados sobre esta enzima, se decidió incluir su estudio en esta tesis doctoral.

II. OBJETIVOS

II. Objetivos

2. OBJETIVOS

El objetivo general de este proyecto es caracterizar los mecanismos de intercambio de acilos en la fracción de fosfolípidos en semillas de girasol en desarrollo y estudiar su implicación en la síntesis del aceite. Para ello se abordaron los siguientes objetivos específicos:

1. Clonar y caracterizar las secuencias de los genes codificantes de las enzimas LPCAT de girasol (*Helianthus annuus*).
2. Estudiar los perfiles de expresión espacio-temporal de las distintas isoformas de *LPCAT* de girasol.
3. Expresar heterológamente los distintos genes *HaLPCAT* en levadura (*Saccharomyces cerevisiae*).
4. Realizar estudios de complementación en levaduras para confirmar la funcionalidad de los mencionados genes.
5. Estudiar el impacto de la expresión de los genes *HaLPCAT* en la composición de los lípidos y conjunto de acil-CoA de levadura.
6. Estudiar el impacto de las enzimas LPCAT de girasol en la incorporación de ácidos grasos poliinsaturados a los lípidos de levadura.
7. Caracterizar *in vitro* las actividades de las enzimas *HaLPCAT*, estudiando la especificidad de sustrato.
8. Complementar el doble mutante de Arabidopsis *lpcat1/lpcat2* con las enzimas LPCAT de girasol.
9. Clonar y caracterizar la secuencia de un gen codificante de la enzima PDCT de girasol.
10. Estudiar el perfil de expresión espacio-temporal de la isoforma clonada de *HaPDCT*.
11. Expresar heterológamente el gen *HaPDCT* en levadura.
12. Caracterizar *in vitro* la actividad de la enzima PDCT de girasol, estudiando su especificidad de sustrato.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MATERIALES

3.1.1. MATERIAL BIOLÓGICO Y CONDICIONES DE CULTIVO

3.1.1.1. *Escherichia coli*

3.1.1.1.1. Estirpe de *Escherichia coli*

Para las clonaciones génicas se ha empleado la estirpe *XLI-Blue MRF'* (Stratagene, EE. UU.), cuyo genotipo es: $\Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 \text{ endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac}$ [F' *proAB lacI^ZAM15 Tn10* (Tet^r)]. El significado de las abreviaturas de los genotipos se encuentra detallado en el Anexo 2.

3.1.1.1.2. Condiciones de cultivo

Los cultivos de *E. coli*, tanto en medio líquido como en medio sólido, se incubaron a 37 °C en un incubador orbital ecotron (Infors HT, Suiza) entre 12 y 16 h.

En medio líquido, las bacterias se cultivaron en tubos estériles con agitación continua a 200 rpm. Las bacterias sin transformar se hicieron crecer en medio SOB (*Super Optimal Broth*) suplementado con MgSO₄ y/o tetraciclina (3.2.1.9.1.) y las bacterias transformadas en medio LB (*Luria-Bertani*), suplementado con el antibiótico de selección adecuado en función del plásmido usado en la transformación.

Los cultivos en medio sólido se realizaron en placas de Petri, con medios suplementados con bactoTM agar (BD, EE. UU.) al 2% (p/v). Las bacterias sin transformar se hicieron crecer en medio LB con tetraciclina y las bacterias transformadas en medio LB con ampicilina. En el caso de emplear la selección de colonias recombinantes con 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido (X-Gal), el medio se suplementó con este compuesto y con isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG).

La composición de los medios y la selección de colonias recombinantes están especificadas en el apartado 3.1.4.1.1.

3.1.1.1.3. Conservación del material biológico

Las cepas bacterianas se conservaron en placas de Petri a 4 °C durante un máximo de un mes.

Para la conservación a largo plazo, se hizo crecer, durante toda la noche, una colonia aislada en 2 ml de medio LB con ampicilina (3.1.4.1.1.) a 37 °C con agitación continua a 200 rpm. Al día siguiente, 500 μ l del cultivo se mezclaron con glicerol estéril a una concentración final del 15% (v/v) en un vial estéril con tampón de rosca, la mezcla se congeló con nitrógeno líquido y se almacenó a -80 °C.

Cuando fue necesaria la siembra en nuevas placas, esta se realizó preferentemente a partir del cultivo congelado, raspando algunas células de la superficie y evitando descongelar todo el volumen contenido en el vial.

3.1.1.2. *Saccharomyces cerevisiae*

3.1.1.2.1. Estirpes de *Saccharomyces cerevisiae*

Para los ensayos de complementación, las caracterizaciones funcionales de enzimas y los análisis lipídicos, se han empleado las estirpes de levaduras detalladas en la Tabla 3.

Tabla 3. Estirpes de *Saccharomyces cerevisiae* empleadas en el presente trabajo.

Estirpe	Sinónimo	Genotipo	Fenotipo	Referencia
Y02431	<i>ale1</i> , <i>lca1Δ</i> , <i>yor175c</i> , o <i>slc4</i>	<i>BY4741 MATα his3Δ1</i> <i>leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i> <i>yor175c::KanMX4</i>	Actividad LPCAT reducida	European <i>Saccharomyces</i> <i>Cerevisiae</i> archive for functional analysis (EUROSCARF)
FBY4137	2Δ.SLC1a	<i>his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0</i> <i>slc1Δ::kanMX4</i> <i>yor175c::LEU2</i> pGREG546Gal::slc1	Doble mutante <i>slc1/slcl4</i> . No viable sin un vector que provea expresión de <i>slc</i>	Benghezal et al., 2007
HJ901		<i>ura3-52 his3-1 leu2-3, 112</i> <i>trp1-289 cpt1::LEU2 ept1-1</i> <i>MATα SUC2 gal2 mal2 mel</i>	No posee actividad colinafosfotransferasa ni etanolaminafosfotransferasa	Hjelmstad et al., 1994
S288C		<i>flo1 flo8-1 hap1 ho bio1</i> <i>bio6</i>		Mortimer y Johnston, 1986

El significado de las abreviaturas de los genotipos se encuentra detallado en el Anexo 2.

3.1.1.2.2. Condiciones de cultivo

Las distintas estirpes de *S. cerevisiae* se cultivaron en un incubador orbital ecotron (Infors HT, Suiza) a 30 °C. Para obtener cultivos en placas de Petri, los medios se suplementaron con bactoTM agar (BD, EE. UU.) al 2% (p/v) y las levaduras se incubaron de 24 a 72 h. En medio líquido, las levaduras se cultivaron en matraces Erlenmeyer estériles y, para una aireación y crecimiento óptimos, el medio constituyó no más del 20% del volumen total del matraz. Los cultivos se incubaron con agitación continua a 200 rpm y durante el tiempo necesario para obtener la densidad óptica deseada en cada caso.

Las levaduras sin transformar se hicieron crecer en medio rico YPD (*Yeast Peptone Dextrose*) suplementado con una fuente de carbono adecuada, generalmente glucosa (3.1.4.1.2.). Las levaduras recombinantes se hicieron crecer en medio mínimo SC (*Synthetic Complete*) cuya composición en aminoácidos y bases nitrogenadas varió en función de la selección auxotrófica y suplementado con una fuente de carbono adecuada (3.1.4.1.2.).

3.1.1.2.3. Conservación del material biológico

Para su uso en fresco, las células de levadura se mantuvieron a 4 °C en placas de Petri durante un máximo de tres meses.

Para su conservación a largo plazo, primero se incubaron las levaduras a 30 °C con agitación continua a 200 rpm hasta obtener un cultivo en fase estacionaria. Posteriormente, en un vial estéril con tampón de rosca, se mezclaron 500 μl del cultivo con 500 μl de glicerol estéril al 30% (v/v) y la mezcla se almacenó a -80 °C.

Cuando fue necesaria una nueva siembra de levaduras, esta se realizó preferentemente a partir del cultivo congelado, raspando algunas células de la superficie y evitando descongelar todo el volumen contenido en el vial.

3.1.1.3. *Agrobacterium tumefaciens*

3.1.1.3.1. Estirpe de *Agrobacterium tumefaciens*

La estirpe de *A. tumefaciens* que se empleó para la transformación de *Arabidopsis thaliana* fue la GV3101/pMP90 (Invitrogen, EE. UU.; [Koncz y Schell, 1986](#)), cuyo genotipo es rpoH+ hrcA+ (Anexo 2). Esta cepa se emplea frecuentemente con vectores binarios para la transformación de dicha planta. Presenta resistencia a rifampicina y gentamicina por lo que suele emplearse con vectores binarios que confieren resistencia a kanamicina, como es el caso del vector pBIN19::35S ([Sayanova et al., 1997](#)).

3.1.1.3.2. Condiciones de cultivo

Los cultivos de *A. tumefaciens*, tanto en medio líquido como en medio sólido, se incubaron a 28 °C en un incubador orbital ecotron (Infors HT, Suiza) entre 12 y 16 h. En medio líquido, las bacterias se cultivaron en tubos estériles con agitación continua a 200 rpm y en medio sólido se cultivaron en placas de Petri, con medios suplementados con bacto™ agar (BD, EE. UU.) al 2% (p/v).

Las bacterias sin transformar se hicieron crecer en medio LB suplementado con rifampicina y gentamicina y las bacterias transformadas en medio LB suplementado con rifampicina, gentamicina y kanamicina (3.1.4.1.2.).

3.1.1.3.3. Conservación del material biológico

Las cepas bacterianas se conservaron en placas de Petri a 4 °C durante un máximo de un mes.

Para la conservación a largo plazo, se hizo crecer, durante toda la noche, una colonia aislada en 2 ml de medio LB con rifampicina y gentamicina (3.1.4.1.2.) a 28 °C con agitación continua a 200 rpm. Al día siguiente, 500 µl del cultivo se mezclaron con glicerol estéril a una concentración final del 15% (v/v) en un vial estéril con tampón de rosca, la mezcla se congeló con nitrógeno líquido y se almacenó a -80 °C.

Cuando fue necesaria la siembra en nuevas placas, esta se realizó preferentemente a partir del cultivo congelado, raspando algunas células de la superficie y evitando descongelar todo el volumen contenido en el vial.

3.1.1.4. Girasol (*Helianthus annuus* L.)

3.1.1.4.1. Variedad de girasol

Como material de trabajo se ha empleado la línea CAS-6 de girasol, perteneciente a la Colección Andaluza de Semillas (CAS). Esta línea presenta una composición estándar de ácidos grasos en su aceite ([Fernández-Moya et al., 2002](#)) (Tabla 1).

3.1.1.4.2. Condiciones de crecimiento

Tras ser sometidas, durante 5 min con agitación, a un tratamiento de esterilización con una solución de lejía al 50% (v/v) conteniendo unas gotas de tritón X-100 (Sigma-Aldrich, EE. UU.), las semillas fueron lavadas con abundante agua y germinadas en placas de Petri con perlita expandida húmeda y unas gotas de oxiclورو de cobre al 50% (p/v). Las semillas se incubaron a 25 °C en oscuridad durante dos o tres días. Posteriormente, las plántulas se colocaron en el centro de discos de turba prensada, Jiffy-7 41 x 42 mm (Bulagro, Bulgaria), que habían sido previamente hidratados durante 20 min y tras una o dos semanas se trasplantaron a macetas con dos litros de turba húmeda. El crecimiento de las plantas tuvo lugar en cámaras de cultivo, bajo condiciones de temperatura, humedad y fotoperiodo controladas. La temperatura de crecimiento fue 25 °C de día

y 15 °C de noche, la humedad relativa osciló entre el 40 y el 50% y la intensidad de luz de 200 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ con fotoperiodo de 16 h. El riego se realizó de forma automática dos veces al día y el abonado dos veces por semana. El abonado se detuvo una semana antes de la recolección de las semillas.

3.1.1.4.3. Recogida de material biológico

Se recogieron muestras a partir de dos tipos de tejidos:

- Semillas en distintos estadios del desarrollo. Se tomaron muestras de 12, 14, 18, 20, 25 y 28 días después de floración (DDF), tomando como primer día de la floración aquel en el las flores de los tres círculos exteriores del capítulo estaban totalmente abiertas.

- Tejidos vegetativos en los estadios iniciales del crecimiento. Se tomaron muestras de raíces, tallos, hojas y cotiledones tras 15 días después de la siembra (DDS).

Las muestras se recogieron al inicio de la fase lumínica del fotoperiodo, se congelaron directamente en nitrógeno líquido para preservar al máximo la integridad del material vegetal y se conservaron a -80 °C. A partir de estas muestras se extrajo el ARN total (3.2.1.1.2.) para experimentos posteriores.

3.1.1.5. *Arabidopsis thaliana* L.

Las plantas de *Arabidopsis* empleadas en este trabajo fueron del ecotipo Columbia 0 (Col-0). El doble mutante *lpcat1/lpcat2* fue aislado y seleccionado a partir de la población de mutantes insercionales SALK-123480 y Sail_357_H01, siendo descrito previamente por Bates et al. (2012). El doble mutante fue confirmado mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, *Polymerase Chain Reaction*) empleando los oligonucleótidos listados en el Anexo 1.

3.1.1.5.1. Condiciones de cultivo

Las semillas, previa germinación, se sometieron a un tratamiento de esterilización, introduciéndolas en tubos de microcentrífuga estériles y sometiéndolas a un primer lavado en etanol al 70% (v/v) durante un minuto. Transcurrido este tiempo, se agitaron a máxima velocidad en un vórtex (IKA®, Alemania) durante unos segundos, se retiró la solución de etanol y se sometieron a un segundo lavado en lejía al 40% (v/v) durante 10 min. Se volvieron a agitar a máxima velocidad, se retiró la solución de lejía y, por último, se realizaron siete lavados consecutivos con agua destilada estéril.

Tras la esterilización, se llevó a cabo la estratificación de las semillas, para sincronizar la germinación. Para ello, se incubaron las semillas en 1 ml de agua a 4 °C en oscuridad durante 3 días.

Los pasos seguidos tras la estratificación variaron en función del uso para el que fuesen destinadas las semillas:

1.- Semillas destinadas a completar su ciclo biológico (condiciones normales)

Las semillas destinadas a completar su ciclo biológico y producir nuevas semillas fueron sembradas directamente en semilleros con tierra húmeda, dispuestos en bandejas. El crecimiento se realizó con fotoperiodo de ciclo largo de 16h/8h (luz/oscuridad), a 24-20°C (luz/oscuridad), con intensidad de luz de 250 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ y humedad del 40-50%.

2.- Semillas crecidas para formar plantas que serán transformadas con *Agrobacterium*

Estas semillas fueron sembradas en macetas con tierra húmeda, dispuestas en bandejas. Se sembraron un total de 15 semillas por construcción en grupos de 5 semillas por maceta. El crecimiento se realizó a igual temperatura, humedad e intensidad de luz que en el caso anterior pero se sometieron primero a fotoperiodo de ciclo corto de 9h/15h (luz/oscuridad) usando abundante fertilizante, para potenciar el crecimiento vegetativo. Además, cuando aparecieron los primeros brotes de inflorescencia, estos se cortaron para estimular el crecimiento de las inflorescencias secundarias y así aumentar el blanco de la transformación. Una vez cortados los primeros brotes de inflorescencias, las plantas se pasaron a cultivar con fotoperiodo de ciclo largo de 16h/8h (luz/oscuridad), para inducir la fase reproductiva. Transcurrida aproximadamente una semana, cuando los brotes de inflorescencias secundarias tenían aproximadamente 8 cm de altura, las plantas estaban listas para la transformación. Dos días antes de la transformación de las plantas, estas se dejaron de regar para evitar la caída del suelo durante la inmersión realizada en la transformación.

En todos los casos, la germinación de las semillas y el crecimiento de las plantas tuvieron lugar en cámaras de cultivo (Aralab, Portugal), bajo condiciones de temperatura y fotoperiodo controladas. La tierra fue desinfectada, antes de la siembra de las semillas, con fungicida sistémico Previcur® N (Bayer, Alemania) para evitar plagas y fue tratada con fertilizante una vez por semana. El riego se realizó de forma manual dos veces por semana mediante inundación de la bandeja, suplementado con solución nutritiva (3.1.4.1.4.); éste se detuvo una semana antes de la recolección de semillas para potenciar su desecación. El ciclo biológico de la planta es de 2 a 3 meses.

3.1.2. OLIGONUCLEÓTIDOS

Todos los oligonucleótidos empleados durante el desarrollo de esta tesis doctoral fueron sintetizados por la empresa *Eurofins Genomics* (Alemania). Tras disolver los oligonucleótidos liofilizados en agua destilada esterilizada, se prepararon alícuotas de los mismos a una concentración de 10 μ M y se conservaron a -20 °C.

El diseño de los oligonucleótidos se realizó tal y como se explica en el apartado 3.2.1.3. haciendo uso de la herramienta *NetPrimer* (Premier Biosoft, EE. UU.; <http://www.premierbiosoft.com>) para el análisis de los mismos.

Los oligonucleótidos empleados para este trabajo se muestran en el Anexo 1.

3.1.3. PLÁSMIDOS Y VECTORES DE EXPRESIÓN

pMBL-T (Dominion, EE. UU.)

El kit pMBL-T (Dominion, EE. UU.; Figura 14) proporciona el vector digerido con la enzima de restricción *EcoRV* y con una timina añadida a cada extremo 3'. Esto aumenta la eficiencia de las ligaciones (3.2.1.6.3.) pues previene la religación del vector, pero obliga a usar como insertos productos de PCR que hayan sido amplificados con polimerasas al adicionar estas una adenina a los extremos 3' de los fragmentos (3.2.1.4.1.).

Este vector de clonación posee el gen de resistencia a ampicilina (Amp^R) y permite emplear la selección de colonias recombinantes con X-Gal.

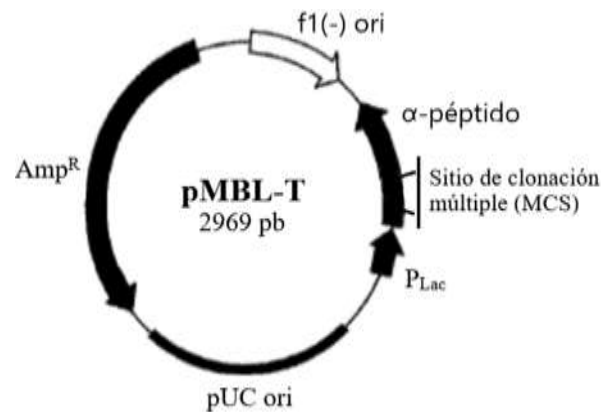


Figura 14. Mapa del plásmido de clonación pMBL-T (Dominion, EE. UU.).

pSpark® II (Canvax Biotech, España)

Este vector (Figura 15) ha sido preparado por digestión con la enzima *EcoRV* y por un tratamiento posterior de los extremos para evitar su religación. Este tratamiento permite la clonación de productos de PCR con extremos romos. Al igual que el vector pMBL-T, posee el gen Amp^R y permite emplear la selección de colonias recombinantes con X-Gal.

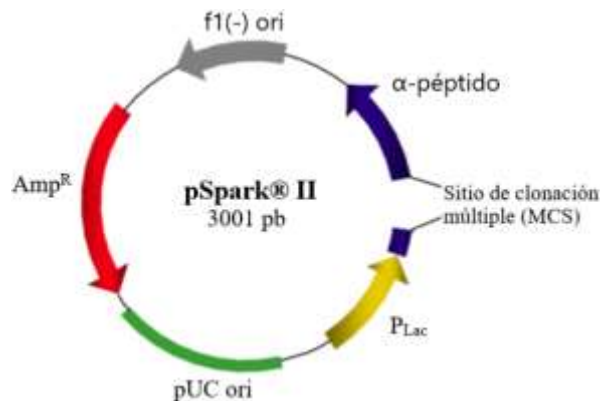


Figura 15. Mapa del plásmido de clonación pSpark® II (Canvax Biotech, España).

pJET1.2 (Thermo Fisher Scientific, EE. UU.)

Este vector de clonación (Figura 16) se comercializa linealizado con extremos romos permitiendo la clonación de productos de ADN con estos extremos. Además, el kit proporciona los reactivos necesarios para la clonación de productos de PCR que hayan sido amplificados mediante PCR estándar y no tengan, por tanto, extremos romos (3.2.1.4.1.). Posee el gen Amp^R y presenta la peculiaridad de que al religarse sin inserto, expresa una enzima de restricción letal que impide el crecimiento. Como resultado, sólo los clones recombinantes que contienen el inserto aparecen en placas de cultivo.

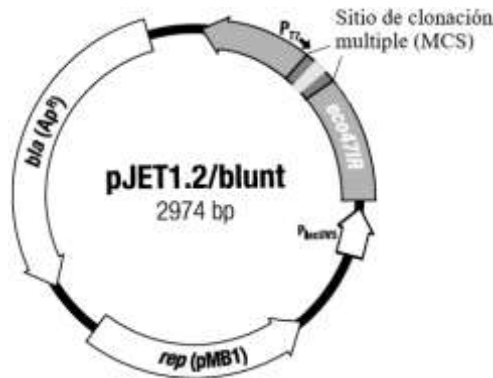


Figura 16. Mapa del plásmido de clonación pJET1.2 (Thermo Fisher Scientific, EE. UU.).

pYES2 (Thermo Fisher Scientific, EE. UU.)

Vector de expresión de proteínas recombinantes en *S. cerevisiae*. Contiene el promotor inducible de levadura *GAL1*, que permite un alto nivel de expresión de proteínas por galactosa y la represión de la expresión por glucosa (Giniger et al., 1985; West et al., 1984), y el terminador de la transcripción *CYC1*. Además, contiene el gen *URA3* que permite la selección de transformantes en levadura y un gen marcador de resistencia a ampicilina para la selección en *E. coli* (Figura 17).

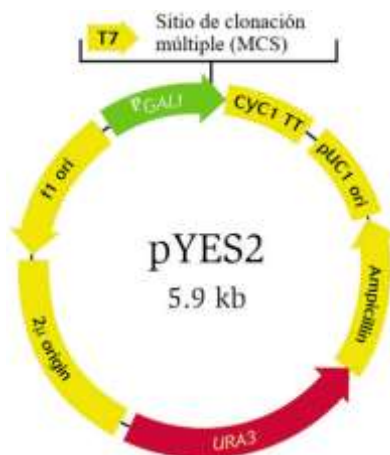


Figura 17. Mapa del plásmido de expresión pYES2 (Thermo Fisher Scientific, EE. UU.).

p416GPD y p423GPD (Mumberg et al., 1995)

Vectores de expresión de proteínas recombinantes en *S. cerevisiae*. Contienen el promotor constitutivo *GPD* y el terminador de la transcripción *CYC1*. Para la selección de los transformantes en *E. coli* estos plásmidos contienen el gen marcador de resistencia a ampicilina, Amp^R, y para la selección en levadura, el plásmido p416GPD contiene el gen *URA3* y el plásmido p423GPD contiene el gen *HIS3* (Figura 18). Ambos plásmidos fueron cedidos por la Dra. Ana Rincón del Departamento de Genética de la Universidad de Sevilla.

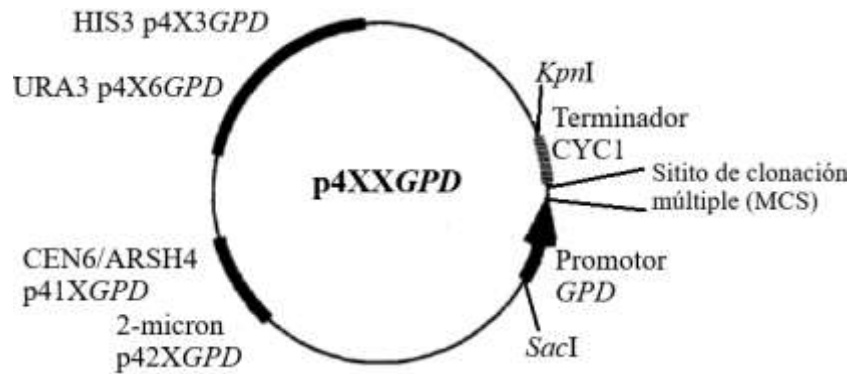


Figura 18. Mapa de los plásmidos de expresión p423GPD y p416GPD (Mumberg et al., 1995).

pBIN19::35S (Sayanova et al., 1997)

Para la transformación de *Arabidopsis* se empleó una versión modificada del vector pBIN19 (Bevan, 1984), uno de los vectores binarios más ampliamente utilizado para transformación de plantas. Este plásmido combina el sitio de clonación pUC19 (Yanisch-Perron et al., 1985) con el sistema de selección de colonias recombinantes por células azules y blancas basado en X-Gal (3.1.4.1.1.). El vector original fue modificado mediante la inserción del promotor constitutivo del virus del mosaico de la coliflor, *CaMV35S*, para que dicho promotor fuerte regule los genes que se pretenden expresar (Sayanova et al., 1997). Este vector fue cedido por la investigadora Olga Sayanova de *Rothamsted Research* (Reino Unido).

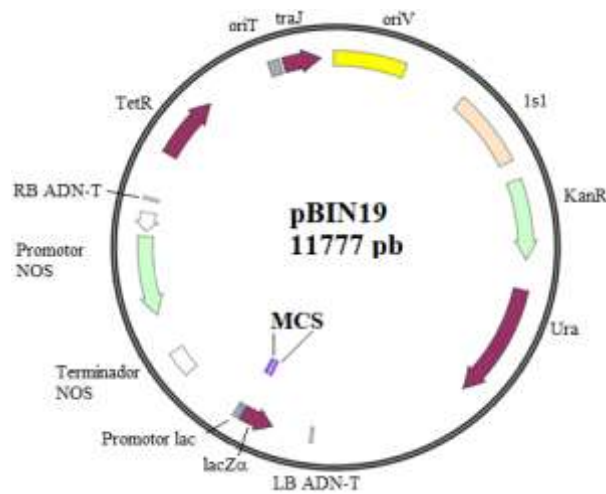


Figura 19. Mapa del plásmido de expresión pBIN19 (Sayanova et al., 1997).

3.1.4. MEDIOS DE CULTIVO, AGENTES DE SELECCIÓN, TAMPONES Y SOLUCIONES

Los medios de cultivo y soluciones se esterizaron en autoclave durante 20 min, a 120 °C y 1 atm de presión y el material de vidrio se esterilizó a 200 °C durante 1 h.

Las soluciones que no podían resistir esas condiciones fueron esterilizadas por filtración mediante un filtro de jeringa *Minisart® 16534-K* (Sigma-Aldrich, EE. UU.) provisto de una membrana de acetato de celulosa de 0.2 µm de poro y 25 mm de diámetro.

3.1.4.1. Medios de cultivo y agentes de selección

Todos los medios de cultivo se prepararon con agua de alta calidad Milli-Q® (Millipore, Reino Unido) y se esterilizaron en autoclave. Para preparar los medios sólidos, antes de esterilizar, se añadió agar. Para los medios para bacterias y levaduras se usó bacto™ agar (BD, EE. UU.) a una concentración de 2% (p/v) y para los medios para *A. thaliana* se usó agar noble (BD, EE. UU.) al 0.6 % (p/v).

Para evitar efectos indeseados por causa de una temperatura elevada, como pérdida de efectividad, degradación o caramelización, los agentes de selección y los azúcares se añadieron al medio de cultivo ya estéril y tibio (a unos 50 °C aproximadamente) y la esterilización de los mismos se llevó a cabo por filtración.

Los medios sólidos en placas de Petri se conservaron a 4 °C y los medios líquidos a temperatura ambiente.

3.1.4.1.1. Medios de cultivo y agentes de selección para *Escherichia coli*

Medios de cultivo

- Medio LB (*Luria-Bertani*): bacto triptona al 1% (p/v), extracto de levadura al 0.5% (p/v) y NaCl al 1% (p/v).

Según las necesidades de cada caso, para la selección de las células transformadas, este medio se suplementó con uno o varios de los siguientes compuestos: IPTG a 100 µg/ml, X-Gal (Promega, EE. UU.) a 80 µg/ml, ampicilina a 100 µg/ml o tetraciclina a 10 µg/ml. El IPTG y la ampicilina se prepararon en agua, el IPTG a una concentración de 200 mg/ml y la ampicilina a 100 mg/ml, y ambos se esterilizaron por filtración. La tetraciclina se preparó a una concentración de 10 mg/ml en etanol. Estos compuestos se conservaron a -20 °C.

- Medio SOB (*Super Optimal Broth*): bacto triptona al 2% (p/v), extracto de levadura al 0.5% (p/v) y NaCl al 0.05% (p/v). pH 7.5.

Este medio se suplementó según la necesidad con MgSO₄ a 20 mM y/o tetraciclina a 10 µg/ml.

Selección de colonias recombinantes mediante X-Gal

El X-Gal es un compuesto usado en la selección de transformantes. Es sustrato de la β-galactosidasa, que lo hidroliza dando lugar a galactosa y 5-bromo-4-cloro-3-hidroxiindol, el cual al oxidarse genera 5,5'-dibromo-4,4'-dicloro-índigo, un compuesto azul. De esta forma, gracias a su color azul, se pueden diferenciar las células que hayan incorporado un vector que posea la secuencia del α-péptido de la β-galactosidasa, religado y sin inserto, como es el caso del pMBL-T. Las células que hayan incorporado el mismo vector pero con un inserto que interrumpa la secuencia del α-péptido, serán de color blanco al no poder expresar la β-galactosidasa. Para llevar a cabo esta selección de colonias recombinantes, además de X-Gal, se añadió al medio IPTG, pues es un fuerte inductor del operón lac que permite la transcripción del gen que codifica la β-galactosidasa.

3.1.4.1.2. Medios de cultivo y agentes de selección para *Agrobacterium tumefaciens*

- Medio LB (Luria-Bertani): Bactotripton a 1% (p/v), extracto de levadura al 0.5% (p/v) y NaCl al 1% (p/v).

Según las necesidades de cada caso, este medio se suplementó con uno o varios de los siguientes compuestos: rifampicina a 50 µg/ml, gentamicina a 50 µg/ml o kanamicina a 50 µg/ml. La rifampicina se preparó en etanol a una concentración de 100 mg/ml y la gentamicina y la kanamicina se prepararon en agua a una concentración de 50 mg/ml y se esterilizaron por filtración. Estos compuestos se conservaron a -20 °C.

3.1.4.1.3. Medios de cultivo y agentes de selección para *Saccharomyces cerevisiae*

Medios de cultivo

- Medio rico YPD (Yeast Peptone Dextrose): extracto de levadura al 1% (p/v), peptona bacteriológica al 2% (p/v) y fuente de carbono.

Las levaduras sin transformar crecieron en medio rico YPD suplementado con glucosa al 2% (p/v) como fuente de carbono. Como excepción, la levadura FBY4137 sin transformar se hizo crecer el medio YPD suplementado con galactosa al 2% (p/v) para inducir la expresión del gen SLC1, necesaria para la viabilidad de la levadura.

- Medio mínimo SC (Synthetic Complete): (NH₄)₂SO₄ al 0.5% (p/v), YNB (Yeast Nitrogen Base) al 0.5% (p/v), mezcla de aminoácidos y bases nitrogenadas al 0.13% (p/v) (Tabla 4) y adición de una fuente de carbono. pH 5.6.

El medio mínimo SC usado para el crecimiento de las levaduras transformadas se suplementó con una fuente de carbono y una mezcla de mezcla de aminoácidos y bases nitrogenadas que variaron en función de la cepa de levadura empleada y de las construcciones incorporadas en las células transformadas.

Fuentes de carbono:

- Células transformadas con el plásmido pYES2: El crecimiento, previo a la inducción, se llevó a cabo con medio suplementado con un 2% (p/v) de rafinosa por ser un azúcar no represor del promotor *GALI*. Para la inducción de la expresión, estas células se hicieron crecer con medio suplementado con rafinosa al 1% (p/v) y con galactosa al 2% (p/v), por ser este último azúcar un inductor del promotor, permitiendo la expresión de las proteínas recombinantes (Giniger et al., 1985; West et al., 1984).

- Células transformadas con plásmidos p423GPD o p416GPD: Las células se hicieron crecer en medio suplementado con un 2% (p/v) de glucosa, ya que estos plásmidos contienen un promotor constitutivo.

- Células de la levadura FBY4137 transformada: Independientemente del plásmido usado en la transformación, el medio usado para crecer estas células se suplementó con un 2% (p/v) de galactosa para permitir la expresión del gen SLC1 y evitar así la doble mutación letal de esta estirpe de levadura.

La glucosa, la rafinosa y la galactosa se prepararon en soluciones al 20% (p/v) en agua, se esterilizaron por filtración y se conservaron a temperatura ambiente.

Mezcla de aminoácidos y bases nitrogenadas:

La mezcla de aminoácidos y precursores de nucleósidos varió en función de la selección auxotrófica a llevar a cabo, de forma que se omitieron de la mezcla aquellos compuestos cuyos genes de síntesis se encontraban en el plásmido a seleccionar. Así, para la selección de los plásmidos pYES2, p416GPD o pGREG546 se omitió de la mezcla el uracilo y para la selección del plásmido p423GPD se usó un medio deficiente en histidina.

La concentración final de cada aminoácido o base nitrogenada en el medio se muestra en la Tabla 4. La mezcla se preparó moliendo las cantidades necesarias de cada componente y se almacenó a temperatura ambiente.

Tabla 4. Mezclas de aminoácidos y bases nitrogenadas.

Aminoácidos	% (p/v)	Bases Nitrogenadas	% (p/v)
L-Arginina	0.002	Adenina sulfato	0.004
L-Aspártico	0.010	Uracilo	0.002
L-Glutámico	0.010		
L-Histidina	0.002		
L-Leucina	0.006		
L-Lisina	0.003		
L-Metionina	0.002		
L-fenilalanina	0.005		
L-Serina	0.039		
L-Treonina	0.021		
L-Triptófano	0.004		
L-Tirosina	0.003		
L-Valina	0.016		

Agentes de selección➤ Ácido 5-fluoroorótico (5-FOA)

El 5-FOA es un compuesto utilizado para seleccionar negativamente las células que contienen el gen funcional *URA3* que codifica para la enzima orotidina-5'-fosfato descarboxilasa, que transforma el compuesto 5-FOA, no tóxico, en 5-fluorouracilo (5-FU), compuesto tóxico que provoca la muerte celular (Figura 20). Esta reacción permitió seleccionar las células que hubieran perdido el plásmido con el marcador de selección *URA3* (3.2.1.12.).

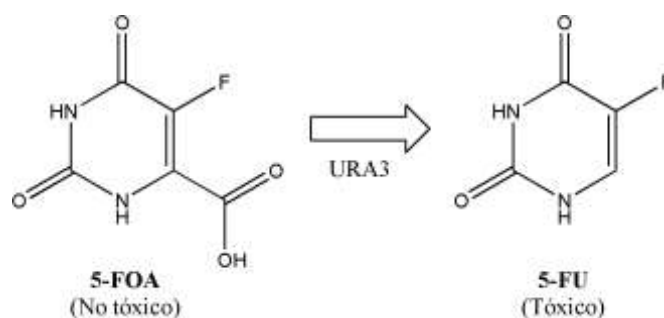


Figura 20. Conversión del ácido 5-fluoroorótico (5-FOA) en 5-fluorouracilo (5-FU) por acción de *URA3*.

El 5-FOA se preparó a una concentración de 100 mg/ml en dimetilsulfóxido (DMSO), se esterilizó por filtración y se almacenó a -20 °C hasta su posterior uso.

- 1-O-alkil-2-liso-*sn*-glicero-3-fosfolina (liso-PAF, *lyso-platelet-activating factor*)

El liso-PAF es un compuesto derivado de la fosfolina con un alquilo en posición *sn*-1 unido mediante enlace éter (Figura 21).

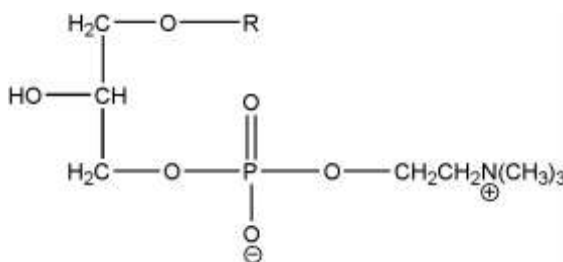


Figura 21. Molécula de 1-O-alkil-2-liso-*sn*-glicero-3-fosfolina (liso-PAF).

Un nivel alto de liso-PAF es tóxico para las levaduras, pero esta toxicidad puede reducirse mediante la actividad LPCAT, gracias a la cual, se lleva a cabo la acilación de este compuesto. Por ello, el mutante de levadura Y02431 (Tabla 3), que tiene mutado el gen SLC4 con actividad LPCAT, es hipersensible a este compuesto.

El liso-PAF usado, 1-O-palmitil-2-liso-*sn*-glicero-3-fosfolina (Sigma-Aldrich, EE. UU.), se preparó al 0.2% (p/v) en agua y se esterilizó por filtración. Esta disolución se preparó el mismo día de uso.

3.1.4.1.4. Medios de cultivo para *Arabidopsis thaliana*

- Solución nutritiva: KNO₃ a 50 mM, KH₂PO₄ a 2.5 mM, MgSO₄ × 7H₂O a 4 mM y Ca(NO₃)₂ × 4H₂O a 2 mM.
- Medio ½ Murashige-Skoog (MS): medio comercial MS (Duchefa Biochemie, Países Bajos) a 4.4 g/l y kanamicina a 50 µg/ml. pH 5.7.

3.1.4.2. Tampones y soluciones para biología molecular

Aislamiento de ácidos nucleicos

- TAE: tris(hidroximetil)aminometano-acetato (Tris-Acetato) a 40 mM y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) a 1 mM, pH 8.0.
- TE: tri(hidroximetil)aminometano-HCl (Tris-HCl) a 10 mM y EDTA a 1 mM, pH 8.0.
- Solución para geles de agarosa: agarosa al 0.8-2% (p/v) en tampón TAE.
- Solución de extracción CTAB 2X: Tris-HCl a 0.1 M (pH 8.0), bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) al 2% (p/v), NaCl a 1.4 M y EDTA a 20 mM (pH 8.0). Añadir ARNasa (Bioline, Reino Unido) a 50 µg/ml, justo antes de usar.

Preparación de células competentes de Escherichia coli

- TJBI: RbCl a 100 mM, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ a 50 mM, acetato potásico a 30 mM, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ a 10 mM y glicerol al 15% (v/v), pH 5,8. Esterilizado por filtración.
- TJBI: ácido 3-morfolino-4-il-propano-1-sulfónico (MOPS) a 10 mM, RbCl a 10 mM, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ a 75 mM y glicerol al 15% (v/v), pH 7.0. Esterilizado por filtración.

Transformación de Saccharomyces cerevisiae

- Tampón plate: acetato de litio a 0.1 M, polietilenglicol (PEG) 4000 al 40% (p/v), EDTA a 1 mM y Tris-HCl a 10 mM (pH 7.5). Esterilizado por filtración.

Transformación de Arabidopsis thaliana y selección de transformantes

- Disolución de infiltración: sacarosa al 5% y Silwet L-77 al 0.05%.

3.1.4.3. Tampones y soluciones bioquímicas

Obtención de la fracción microsomal de levadura

- Tampón de lisis: Tris(hidroximetil)aminometano (Tris base) a 20 mM, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ a 10 mM, EDTA a 1 mM, $(NH_4)_2SO_4$ a 0.3 M, glicerol al 5% (v/v) y ditioneitol (DTT) a 2 mM (añadido justo antes de usar), pH 7.5.
- Tampón de mantenimiento para ensayo HaLPCAT en su reacción directa (tampón fosfato de potasio con glicerol): K_2HPO_4 a 71.7 mM, KH_2PO_4 a 28.3 mM y glicerol al 20% (v/v), pH 7.2.
- Tampón de mantenimiento para ensayo HaLPCAT en su reacción inversa (tampón fosfato de potasio): K_2HPO_4 a 71.7 mM, KH_2PO_4 a 28.3 mM, pH 7.2.
- Tampón de mantenimiento para ensayo HaPDCT (Tampón GTE): Tris base a 50 mM, EDTA a 1 mM, glicerol al 20% (v/v), pH 7.4.

Ensayo de actividad LPCAT in vitro

- Tampón fosfato de potasio: K_2HPO_4 a 71.7 mM y KH_2PO_4 a 28.3 mM, pH 7.2.

Ensayo de actividad PDCT in vitro

- Tampón de reacción 4X: MOPS a 200 mM, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ a 80 mM y tritón X-100 al 1.8% (v/v), pH 7.5.

Síntesis de DAG

- Tampón Tris-HCl: Tris base a 1 M, pH 8.0.
- Disolución de sales biliares: colato de sodio al 0.1% (p/v).

Obtención de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAMES)

- Mezcla de metilar para material biológico: metanol/tolueno/dimetoxipropano/ácido sulfúrico (39:20:5:2, v/v/v/v).
- Mezcla de metilar: metanol/tolueno/ ácido sulfúrico (88:10:2, v/v/v)

Preparación de acil-CoAs

- Tampón acetato de sodio: ácido acético a 100 mM, acetato de sodio a 100 mM, pH 5.0.

Análisis del conjunto de acil-CoAs

- Tampón de extracción: 2-propanol al 50% (v/v), KH_2PO_4 a 25 mM, ácido acético glacial al 1.25% (v/v) y albúmina de suero bovino (*Bovine Serum Albumin*, BSA) al 0.1% (p/v), pH 7.2.
- Reactivo cloroacetaldehído 2X: cloroacetaldehído a 1 M, dodecilsulfato sódico (SDS) al 1% (p/v) y tampón citrato 0.3 M, pH 4.0.
- Tampón citrato: ácido cítrico a 187 mM y citrato de sodio dihidratado a 113 mM, pH 4.0.

3.2. MÉTODOS

3.2.1. MÉTODOS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

3.2.1.1. Extracción de ácidos nucleicos

3.2.1.1.1. Protocolos de bacterias

Extracción de ADN plasmídico

Las extracciones de ADN plasmídico se realizaron a partir de cultivos de *E. coli* que habían sido incubados a 37 °C entre 12 y 16 h con agitación continua a 200 rpm en 3 ml de medio LB con ampicilina (3.1.4.1.1.). Estos cultivos se prepararon a partir de una colonia de *E. coli* transformada en la cual se había confirmado la presencia del plásmido de interés (3.2.1.9.1.).

Para realizar el aislamiento del ADN plasmídico de estos cultivos se usó el kit comercial *Isolate II Plasmid Mini Kit* (Bioline, Reino Unido), basado en el método de extracción por lisis alcalina (Sambrook et al., 1989), y se siguieron las instrucciones del fabricante.

3.2.1.1.2. Protocolos de plantas

Aislamiento de ARN total

Para aislar el ARN total se macharon con mortero y maza estériles, aproximadamente 100 mg de los tejidos previamente congelados a -80 °C, hasta que se obtuvo un polvo fino. Para ello se colocó el mortero en hielo y se añadió de forma constante nitrógeno líquido. Para triturar semillas de girasol, estas fueron desprovistas previamente del pericarpio. A partir de estos 100 mg de tejido triturado se extrajo el ARN total siguiendo las instrucciones del kit comercial *Spectrum Plant Total ARN kit* (Sigma-Aldrich, EE. UU.). Para evitar la contaminación con ADNg, las

muestras de ARN se trataron con ADNasa, usando el kit comercial *DNA-free™ DNA Removal Kit* (Thermo Fisher, EE. UU.). Se confirmó que el ARN total obtenido era de alta calidad, midiendo su absorbancia a 230, 260 y 280 nm (3.2.1.2.) y realizando una electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v) (3.2.1.5.1.) en la que se deben de observar las bandas discretas correspondientes a los ARN ribosómicos 25S y 18S en un relación aproximada de 2:1.

Síntesis de la primera cadena de ADN complementario (ADNc)

A partir de entre 0.1 y 5 µg de ARN total se sintetizó ADNc siguiendo las instrucciones del kit *Ready-To-Go™ T-Primed First-Strand Kit* (GE Healthcare, Reino Unido).

Haciendo uso de la retrotranscriptasa del virus de la leucemia murina de moloney (*Moloney Murine Leukemia Virus*, MMLV) y del cebador *Not I-d(T)₁₈* que hibrida en el extremo 3' del ARNm (ambos proporcionados por el kit), se generó una primera cadena de ADN complementaria al molde de ARN con una secuencia extra conocida en el extremo 3'. Gracias a esta secuencia extra añadida, el ADNc pudo usarse para amplificar el extremo 3' de los genes en reacciones RACE 3' (*Rapid Amplification of cDNA Ends*, Amplificación rápida de los extremos del ADNc), haciendo uso del oligonucleótido FA2Z (Anexo 1) que hibridaba en dicha secuencia. Además, el ADNc sintetizado también se usó como molde en clonaciones génicas mediante reacciones de PCR estándar o de alta fidelidad y en el análisis de expresión génica mediante PCR cuantitativa.

Síntesis de ADN complementario (ADNc) para reacciones RACE 5'

La síntesis de ADNc con el extremo 5' modificado, necesario para las reacciones de PCR RACE 5', se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del kit *SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit* (Clontech, EE. UU.) usando como molde ARN total. Para ello, se preparó una mezcla que contenía el tampón *First-Strand* suministrado con el kit, 2 mM de DTT, 1 mM de una mezcla equimolar de dNTPs (dATP, dCTP, dGTP y dTTP), 100 U de inhibidor de ARNasas, entre 10 ng y 1 µg de ARN total, 1 µl de *5'-CDS Primer-A*, 1 µl de *SMARTer II A oligo* y 10 U de la retrotranscriptasa *SMARTScribe* (una variante de la retrotranscriptasa del virus MMLV) en un volumen final de 10 µl.

Extracción de ADN genómico (ADNg)

El aislamiento de ADNg se llevó a cabo siguiendo el método descrito por [Murray y Thompson \(1980\)](#). Para ello, se tomaron 2.5 g de hojas frescas de la planta a estudiar, se congelaron rápidamente con nitrógeno líquido y se trituraron con mortero y maza estériles hasta la obtención de un polvo fino. La muestra se pasó a un tubo de plástico estéril y se añadieron, mezclando por inversión, 5 ml de solución CTAB 2X con ARNasa (3.1.5.2.). La mezcla se incubó a 65 °C durante 20 min y, posteriormente, se añadieron 5 ml de cloroformo mezclando por inversión. Tras 2 min de centrifugación a 15.000 x g, se traspasó la fase acuosa a un nuevo tubo, se añadieron 5 ml de isopropanol, mezclando inmediatamente por inversión, y la muestra se incubó durante 1 o 2 min a temperatura ambiente. Tras una nueva centrifugación de 5 min a 3000 x g, apareció un precipitado amarillento de ADNg. Este precipitado se lavó con etanol al 70% (v/v), se centrifugó 5 min a 3000 x g, se desechó el sobrenadante y se dejó secar en la campana. Una vez seco, el ADNg se resuspendió en 875 µl de agua, se cuantificó (3.2.1.2.) y se visualizó en gel de agarosa al 0.8% (p/v), usando entre 1 y 5 µl. El ADNg se almacenó a -20 °C.

3.2.1.2. Cuantificación de ácidos nucleicos

Las concentraciones y purezas de las preparaciones de ácidos nucleicos se determinaron mediante el uso de un *Nanodrop 2000* (Thermo Fisher Scientific, EE. UU.) que mide absorbancias a 260 nm y 280 nm.

La absorbancia medida a 260 nm permite estimar la concentración de los ácidos nucleicos. Para una preparación de ADN puro de doble cadena, una unidad de absorbancia a 260 nm corresponde a una concentración de 50 µg/ml mientras que para una preparación de ARN puro una unidad de absorbancia a esta longitud de onda corresponde a una concentración de 40 µg/ml.

Por otro lado, las relaciones de las absorbancias medidas a 230, 260 y 280 nm indican la pureza de una preparación. Una preparación de ADN tiene una pureza óptima si presenta una relación 260/280 entre 1.8 y 2.0 y una relación 260/230 entre 2.0 y 2.2 y una preparación de ARN con una pureza óptima presenta relaciones 260/280 y 260/230 entre 1.8 y 2.2. Relaciones apreciablemente diferentes a estas podrían indicar la presencia de contaminantes como proteínas o fenoles que absorben cerca de estas longitudes de onda.

Para cuantificar se usaron 2 µl de muestra y como blanco se usó la solución en la que se encontraban disueltos los ácidos nucleicos purificados.

3.2.1.3. Diseño de oligonucleótidos

Diseño y características generales de los oligonucleótidos

Todos los oligonucleótidos empleados en este trabajo fueron sintetizados por la empresa *Eurofins Genomics* (Alemania) y se muestran en el Anexo 1. El diseño de estos, se realizó de forma que cumpliesen, en la medida de lo posible, los siguientes requisitos:

- Longitud de entre 18 y 25 pb. Esta longitud es lo suficientemente larga para obtener una especificidad adecuada y lo suficientemente corta como para que los oligonucleótidos se unan fácilmente al molde a la temperatura de la etapa de alineamiento de secuencias durante la PCR.
- Temperatura de hibridación (T_m) igual o menor a 72 °C. La T_m de cada oligonucleótido viene especificada por la empresa que los sintetiza pero puede calcularse de forma aproximada mediante la ecuación:

$$T_m = 4 \times (G + C) + 2 \times (A + T)$$

Siendo:

G = Guanina.

C = Citosina.

A = Adenina.

T = Timina.

- Contenido de G+C de aproximadamente 50%.
- No han de contener nucleótidos consecutivos iguales o motivos repetidos, ya que estos pueden hibridarse inapropiadamente.
- Extremo 3' con un par de G y/o C. Esto ayuda a promover la unión específica en el extremo 3' debido a la unión más fuerte que se da entre las bases G y C en comparación con A y T. Se deben evitar más de 3 G o C en las últimas 5 bases en el extremo 3'.
- No han de formar estructuras secundarias, ya que esto reduce en gran medida la disponibilidad de oligonucleótido para la reacción. Las estructuras secundarias pudieron evitarse gracias a la herramienta *NetPrimer* (Premier Biosoft, EE. UU.) que mostraba las distintas estructuras secundarias que se generaban en los distintos primers diseñados.

- Aquellos oligonucleótidos que se vayan a usar en una misma PCR no deben hibridar entre ellos y sus temperaturas de hibridación deben de ser lo más parecidas posible para maximizar el rendimiento en la formación del producto de PCR. Diferencias de 5 °C o más podrían dar lugar a que no se produzca la amplificación. La herramienta *NetPrimer* (Premier Biosoft, EE. UU.) permitió visualizar las estructuras formadas entre los distintos oligonucleótidos, de forma que se pudieron elegir aquellas parejas cuyos oligonucleótidos que no hibridasen entre sí.

Diseño de oligonucleótidos con dianas de restricción

Para realizar clonaciones en los sitios de clonación múltiple (*Multiple Cloning Site*, MCS) de los plásmidos de expresión es necesario que el gen a clonar haya sido amplificado con oligonucleótidos que posean dianas de restricción adecuadas en sus extremos. Para el diseño de dichos oligonucleótidos, lo primero que se realizó fue la elección de las dianas de restricción. Para ello, haciendo uso del programa *NEBcutter V2.0* (Vincze et al., 2003), se obtuvo una lista de enzimas cuyas dianas de restricción no se encontraban dentro de la secuencia del gen de interés. A continuación, se anotaron sólo aquellas que poseían dianas en el MCS del plásmido en el que se quería clonar. De aquellas enzimas que cumplían estos dos requisitos, se seleccionaron para cada caso sólo dos enzimas que generasen extremos cohesivos diferentes y que permitieran la orientación correcta del fragmento de ADN insertado, manteniendo así el sentido correcto de lectura.

Una vez elegidas estas dianas de restricción, se diseñó una pareja de oligonucleótidos específicos del fragmento a ligar, siguiendo las recomendaciones del apartado anterior y añadiéndoles en los extremos 5' las dianas de restricción elegidas, precedidas de nucleótidos adicionales para mejorar la eficiencia de corte de las endonucleasas. En la página web <https://www.neb.com> se dispone de una tabla que resume el número óptimo de nucleótidos adicionales a añadir según la enzima usada.

3.2.1.4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Todas las amplificaciones se llevaron a cabo en un termociclador *MJ Mini™ Personal* (Bio-Rad, EE. UU.). Dependiendo de la finalidad y el molde a amplificar, se llevaron a cabo distintos tipos de PCR.

3.2.1.4.1. PCR estándar

Para la PCR estándar se utilizó la enzima *i-Taq™ DNA Polymerase* (Intron Biotechnology, Corea) que posee una fidelidad relativamente baja por carecer de actividad 3'-5' exonucleasa (actividad correctora de errores). Esta enzima permite la adición de una adenina extra a los extremos 3' de los fragmentos de ADN amplificados, facilitando la clonación de éstos en el vector pMBL-T (3.1.4.).

Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 20 a 50 µl conteniendo el tampón comercial de la enzima, 2 mM de MgCl₂, 1 mM de una mezcla equimolar de dNTPs (dATP, dCTP, dGTP y dTTP), 0,5 µM de cada oligonucleótido, de 1 ng a 1 µg de ADNc, de 1 a 2.5 U de enzima y agua destilada esterilizada.

La mezcla se sometió a una activación de la enzima y primera desnaturalización del ADN a 94 °C durante 2 min. Posteriormente, se realizaron de 30 a 40 ciclos en los que la mezcla se sometió primero a una etapa de desnaturalización a 94 °C durante 20 s, después, a una etapa de alineamiento de secuencias de 20 s a una temperatura entre 50 y 65 °C, preferentemente 2 °C por debajo de la T_m más baja de los dos oligonucleótidos y por último, a una etapa de extensión a 72

°C. La duración de esta última etapa varió en función de la longitud del fragmento a amplificar, siendo de 30 s para fragmentos menores a 500 pb, de 40 s para fragmentos de entre 500 pb y 1 kb y de 1 min/kb para fragmentos mayores a 1 kb. Finalizados estos ciclos, la mezcla se sometió a 72 °C durante 5 min para la extensión final de las cadenas.

3.2.1.4.2. Reacción de PCR de alta especificidad y fidelidad

En determinados casos, para aumentar la fidelidad de copia, se utilizó la enzima *Velocity™ DNA Polymerase* (Bioline, Reino Unido). Esta enzima además de la actividad 5'-3' ADN polimerasa posee actividad 3'-5' exonucleasa (actividad correctora), aumentando 50 veces la fidelidad en la síntesis de ADN en comparación con la *i-Taq* polimerasa (Mo et al., 1991; Fujii et al., 1999). Al no poseer actividad transferasa terminal, los fragmentos sintetizados con esta enzima poseen extremos romos, facilitando la clonación de estos en los vectores pSpark o pJET1.2.

Las reacciones de PCR de alta especificidad y fidelidad se llevaron a cabo en un volumen final de 50 µl en el tampón específico comercial de la enzima conteniendo 1 mM de una mezcla equimolar de dNTPs (dATP, dCTP, dGTP y dTTP), 0.4 µM de cada oligonucleótido, de 50 pg a 10 ng de ADNc, 1 U de enzima y agua destilada esterilizada.

Inicialmente, la mezcla se sometió a una activación de la enzima y primera desnaturalización a 98 °C durante 2 min. Posteriormente, se realizaron de 25 a 35 ciclos en los que la mezcla se sometió primero a una etapa de desnaturalización a 98 °C durante 30 s, una etapa de alineamiento de secuencias durante 30 s a una temperatura entre 50 y 68 °C, preferentemente de 2 a 5 °C por debajo de la T_m más baja de los dos oligonucleótidos, y una etapa de extensión a 72 °C con una duración que varió en función de la longitud del fragmento a amplificar, siendo la relación de 15 a 30 s/kb. Finalmente, la mezcla se sometió a 72 °C durante 10 min para la extensión final de las cadenas.

3.2.1.4.3. Adenilación de los productos de PCR

En los casos en los que se quiso introducir un fragmento de ADN con extremos romos amplificado con la polimerasa de alta especificidad y fidelidad en el vector de clonación pMBL-T, se llevó a cabo previamente la adición de desoxiadenosina a los extremos 3' de los fragmentos romos utilizando la enzima *i-Taq™ DNA Polymerase* (Intron Biotechnology, Corea). Para ello, se añadieron al producto de la PCR de alta especificidad y fidelidad previamente purificado todos los componentes necesarios para realizar una PCR estándar exceptuando los oligonucleótidos, y la mezcla se incubó a 72 °C durante 15 min.

3.2.1.4.4. PCR de colonias

En la PCR de colonias se lleva a cabo la amplificación directa de secuencias nucleotídicas a partir de las colonias de bacterias o levaduras sin necesidad del aislamiento previo del ADN. Esta PCR permitió identificar de entre las colonias crecidas en una placa de transformación, aquellas que son portadoras de las secuencias de interés, al hacer uso de una pareja de oligonucleótidos específicos del vector, diseñados a partir de las regiones que flanquean el MCS. Las secuencias de los oligonucleótidos usados se detallan en el Anexo 1.

La mezcla de reacción y las condiciones de amplificación fueron las mismas que las de una PCR estándar con algunas salvedades. Para favorecer la rotura de la pared celular, la desnaturalización inicial a 94 °C se realizó durante 10 min. El ADN molde se sustituyó por 10 µl de una suspensión de la colonia a analizar en agua destilada estéril o bien por la colonia de interés tomada con una punta de pipeta o palillo estéril y resuspendida en la mezcla de reacción. El volumen final de reacción fue de 25 µl.

En otras ocasiones, para la realización de esta PCR se usó la solución *DreamTaq Green DNA Polymerase PCR Master Mix 2 X* (Thermo Fisher Scientific, EE. UU.), que es una mezcla de reacción comercial que contiene la enzima *DreamTaq* ADN polimerasa, MgCl₂, dNTPs y el tampón *DreamTaq* verde 10 X con dos colorantes que permiten la carga directa del producto de PCR en un gel de agarosa. Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 25 µl, conteniendo la mezcla de reacción de PCR, 0.4 µM de cada oligonucleótido y la colonia de interés. En este caso, la mezcla de reacción se sometió a una activación de la enzima y primera desnaturalización del ADN a 95 °C durante 3 min. Posteriormente, se realizaron de 25 a 40 ciclos en los que la mezcla se sometió primero a una etapa de desnaturalización a 95 °C durante 30 s, una etapa de alineamiento de secuencias a una temperatura 5 °C inferior a la T_m más baja de los dos oligonucleótidos durante 30 s y una etapa de extensión a 72 °C con una duración de 1 min por kb del fragmento a amplificar. Finalmente la mezcla se sometió a 72 °C durante 10 min para la extensión final de las cadenas.

3.2.1.4.5. Amplificación rápida de los extremos del ADNc (RACE)

RACE 3'

Para amplificar el extremo 3' del ADNc se realizó una primera PCR de alta especificidad y fidelidad usando como molde ADNc de girasol de la línea CAS-6 preparado para tal propósito (3.2.1.1.2.). Como cebador para el sentido directo se usó un oligonucleótido específico del gen a clonar, diseñado a partir de un fragmento interno del mismo y como cebador para el sentido inverso se usó el oligonucleótido (FA2Z) diseñado para que hibride en la secuencia extra añadida al extremo 3' del ADNc durante su síntesis.

Esta PCR se realizó tal y como se indica en el apartado 3.2.1.4.2. con la salvedad de que en este caso, debido a la inespecificidad del cebador FA2Z, este se añadió al doble de concentración.

Como el nivel de amplificación no específica en esta reacción era demasiado alta, se procedió a realizar una PCR anidada (*Nested PCR*) con una parte alícuota del producto de la primera reacción (1 µl del producto diluido 1/50). En esta segunda PCR, también de alta especificidad y fidelidad, se usó como cebador para el sentido directo un oligonucleótido específico del gen de interés diseñado a partir de un fragmento interno del mismo, pero más cercano al extremo 3' que el cebador usado en la primera PCR y como cebador para el sentido inverso, el oligonucleótido FA2Z. Al igual que en la primera reacción, el cebador FA2Z se añadió al doble de concentración. Para obtener la secuencia del extremo 3' del gen el producto de la segunda PCR se clonó y se secuenció.

Se pudo confirmar que el producto amplificado pertenecía al gen de interés por el solapamiento de su secuencia con la del fragmento interno previamente secuenciado. Además, tras el ensamblaje *in silico* de la secuencia del extremo 3' y de la secuencia del fragmento interno, se comprobó que la secuencia clonada era correcta realizando en la base de datos del NCBI una búsqueda de proteínas homólogas con el algoritmo *blastp*.

Los oligonucleótidos usados se detallan el Anexo 1.

RACE 5'

Para amplificar el extremo 5' de los distintos ADNc se realizó una primera PCR de alta especificidad y fidelidad usando como molde ADNc de girasol de la línea CAS-6 preparado para tal propósito (3.2.1.1.2.). Esta PCR se realizó con 5 µl de la mezcla comercial *Universal Primer Mix* (UPM), suministrada por el kit *SmartTMRACE cDNA amplification kit* (Clontech, Japón), que contiene dos oligonucleótidos, UPM1 y UPM2, que hibridan en la secuencia que se añadió al ADNc durante su síntesis, y con un oligonucleótido específico del gen a clonar, diseñado a partir de un fragmento interno del mismo.

Al igual que ocurre con las reacciones RACE 3', la amplificación de esta reacción es muy inespecífica por lo que se procedió a realizar una segunda PCR con 5 µl del producto de la primera PCR diluido 1/50. En esta segunda PCR se usaron como cebadores el oligonucleótido comercial *Nested Universal Primer* (NUP) suministrado por el kit *SmartTMRACE cDNA amplification kit* (Clontech, Japón), que al igual que el UPM hibrida en la secuencia añadida al extremo 5' del ADNc durante su síntesis, y un oligonucleótido específico del gen de interés. Ambos oligonucleótidos hibridan en una zona más interna que los usados en la primera PCR. Para obtener la secuencia del extremo 5' del gen el producto de la segunda PCR se clonó y se secuenció.

La confirmación de que el producto amplificado pertenecía al gen a clonar, se llevó a cabo de igual forma que con la secuencia del extremo 3' (apartado anterior).

Los oligonucleótidos usados se detallan en el Anexo 1.

3.2.1.4.6. Análisis de expresión génica mediante PCR cuantitativa

El análisis de expresión génica se llevó a cabo por triplicado, usando, para cada tejido, ADNc (3.2.1.1.2.) obtenido a partir de tres muestras biológicas independientes. Además, para cada replicado biológico se llevaron a cabo dos replicados técnicos.

Los oligonucleótidos usados se diseñaron de forma que fuesen específicos para cada isoforma, dando lugar a un único producto de PCR, y que amplificasen una región de entre 100 y 300 pb, con el fin de obtener una mayor eficiencia en la amplificación. Siempre que fuese posible, estos oligonucleótidos se diseñaron en la región 3'-UTR.

Como reactivo para la emisión de fluorescencia se empleó *SYBR® Green* (Qiagen, Alemania). Las reacciones de amplificación a tiempo real se realizaron en un volumen final de 12 µl de mezcla de reacción *QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix* (Qiagen, Alemania), que proporciona una concentración final de MgCl₂ de 2.5 mM, 0.4 µM de cada oligonucleótido, 2 µL de ADNc usando la dilución adecuada en función de los resultados obtenidos en la recta de calibrado explicada en este apartado y agua libre de ARNasas. Además de estas reacciones, se llevaron a cabo reacciones de control negativo sin ADNc, usando en su lugar agua o ARN total.

Las reacciones se llevaron a cabo en placas de polipropileno de 48 pocillos (Stratagene®, Alemania) cubiertas con tapas adhesivas *Optical cap* (Stratagene®, Alemania) y el análisis se llevó a cabo en un sistema *MiniOpticonTM System* acoplado a una base *MJ MiniTM Gradient Thermal Cycler* (Bio-Rad, EE. UU.). El uso del programa *CFX MaestroTM Software* (Bio-Rad, EE. UU.) permitió monitorizar las reacciones a tiempo real.

Las mezclas de reacción se sometieron a una incubación inicial a 50 °C durante 2 min, seguida de una etapa de activación de la polimerasa y primera desnaturalización del ADN a 95 °C durante 15 min. Posteriormente, se realizaron 40 ciclos que consistían en una primera etapa de desnaturalización a 94 °C durante 15 s, una fase de alineamiento de oligonucleótidos de 30 s a 62 °C y una etapa de extensión a 72 °C de 15 s. Finalmente, se realizó la curva de desnaturalización comenzando a 70 °C y terminando a 90 °C, con un incremento de 0.2 °C/s, produciéndose una extensión final de los fragmentos obtenidos.

La presencia de un único pico aislado en las curvas de desnaturalización, en las que se representa la fluorescencia como una función de la temperatura (Ririe et al., 1997), permitió confirmar la ausencia de dímeros de oligonucleótidos y la especificidad de productos de PCR. Además, la especificidad de productos de PCR se corroboró mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% (p/v).

Para analizar los resultados de expresión génica se usó el parámetro Ct (ciclo umbral) que coincide con el número de ciclo en el cual la señal de fluorescencia supera la línea base. Este parámetro se determina en la fase exponencial de la curva de amplificación, en la cual existe una relación lineal entre el logaritmo de cambio de fluorescencia y el número de ciclos, y por tanto, se puede utilizar para calcular de forma fiable y precisa la cantidad inicial de molde presente en la reacción. Los resultados de expresión génica se cuantificaron de forma relativa, es decir, los valores de Ct de los genes a estudiar se relativizaron a los Ct de un gen calibrador (*housekeeping gene*), cuyos niveles de expresión son constantes en los distintos tejidos de estudio (Sánchez-García et al., 2010). El gen calibrador usado en este trabajo fue el gen de la actina de girasol (*HaACT1*; número de acceso de *GenBank*: FJ487620).

El primer paso para determinar la eficiencia de amplificación de cada pareja de oligonucleótidos fue preparar diluciones seriadas del ADNc de un tejido en concreto, en este caso de semilla en desarrollo de 14 DDF, y realizar una recta de calibrado con triplicados de cada dilución, representando los valores de Ct frente al logaritmo de las diferentes diluciones de ADNc. Esta recta de calibrado se realizó tanto para los genes de estudio como para el gen calibrador actina. Además de determinar la eficiencia de amplificación, mediante la ecuación que se muestra a continuación, estas rectas indicaban si las condiciones de ensayo eran aceptables.

$$\text{Eficiencia de amplificación} = \left(10^{(-1/\text{pendiente})} - 1 \right) \times 100$$

Posteriormente, se realizaron las reacciones de PCR a tiempo real de los genes de estudio y del gen calibrador usando ADNc de los distintos tejidos a analizar. Tras ajustar los valores de los Ct obtenidos a sus rectas de calibrado, los valores del gen calibrador fueron tomados como cero y los datos de Ct de los genes de estudio fueron relativizados al gen calibrador siguiendo el método del doble incremento de Ct de Livak (Livak y Schmittgen, 2001).

3.2.1.5. Separación y purificación de ácidos nucleicos

3.2.1.5.1. Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa

La separación de fragmentos de ADN o ARN ya sea únicamente para su detección y/o posterior purificación, se llevó a cabo mediante electroforesis en gel de agarosa (Sambrook et al., 1989).

Los geles de agarosa se prepararon en tampón TAE con una concentración de agarosa variable (3.1.4.2.). Para confirmar la calidad del ARN total obtenido (3.2.1.1.2.) la electroforesis se realizó con una concentración de agarosa del 1% (p/v), para separar bandas de ADN mayores a 1 Kb la concentración de agarosa fue del 0.8% (p/v) y para separar bandas de ADN de menor tamaño la concentración fue del 2% (p/v). La mezcla se calentó para disolver la agarosa, se dejó enfriar durante 2 o 3 min y, a continuación, por cada 100 ml de gel se añadieron 5 µl de *RedSafe™ Nucleic Acid Staining Solution* (20000 X) (Intron Biotechnology, Inc., Corea), un agente intercalante fluorescente que permite la visualización de los ácidos nucleicos. Por último, se vertió la solución sobre un molde y se dejó enfriar hasta producir un gel rígido.

Antes de ser sometidas a electroforesis, se añadió a las muestras una cantidad adecuada de tampón de carga (*DNA loading Dye*; Thermo Fisher Scientific, EE. UU.). Para determinar el tamaño de los fragmentos de ADN se emplearon los marcadores de peso molecular *GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder* (Thermo Fisher Scientific, EE. UU.) o *MassRuler™ DNA Ladder Mix* (Thermo Fisher Scientific, EE. UU.).

Las electroforesis se llevaron a cabo en una cubeta horizontal alimentada por una fuente *PowerPac* (Bio-Rad, EE. UU.), aplicando diferencias de potencial entre 80 y 120 V. La visualización de los geles y el almacenamiento de las imágenes se llevaron a cabo con un

transiluminador de luz ultravioleta *Chemi Genius2 Bio-Imaging System* (Syngene, India), usando el programa *GeneSnap* (Syngene, India).

3.2.1.5.2. Purificación de fragmentos ADN separados mediante electroforesis

Las bandas de ADN a purificar se cortaron del gel de agarosa con una cuchilla estéril, usando luz ultravioleta de baja intensidad para visualizarlas. Para evitar daños en el ADN la banda expuso el menor tiempo posible a la luz ultravioleta. El aislamiento de los fragmentos de ADN se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del kit *ATP™ Gel/PCR Extraction kit* (ATP Biotech Inc., Taiwán).

3.2.1.6. Tratamientos enzimáticos del ADN

3.2.1.6.1. Digestión del ADN con endonucleasas de restricción

Todas las endonucleasas y tampones usados para llevar a cabo las digestiones, fueron suministrados por *New England Biolabs* (Reino Unido). Para realizar la ligación de un fragmento de ADN en un vector de expresión fue necesario llevar a cabo previamente las digestiones del vector de expresión y de la construcción de dicho fragmento en el vector de clonación. Ambas reacciones de digestión fueron realizadas haciendo uso de las mismas endonucleasas y se llevaron a cabo a 37 °C durante el tiempo necesario según las instrucciones del fabricante, que varió entre 15 min y 1 h. Las mezclas de reacción se realizaron en el tampón suministrado con la enzima conteniendo 1 µg del ADN plasmídico, 10 U de la enzima de restricción y agua destilada esterilizada hasta un volumen final de 50 µl. Las digestiones con dos enzimas de restricción se realizaron en un tampón compatible para ambas enzimas. Cuando fue requerido, las enzimas se inactivaron siguiendo las indicaciones de la casa comercial. Los productos de las reacciones de digestión fueron purificados antes de realizar las ligaciones.

También se llevaron a cabo reacciones de digestión con la finalidad de comprobar la presencia de un inserto en un plásmido recombinante antes de que este fuera mandado a secuenciar. En estos casos las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 15 µl.

3.2.1.6.2. Desfosforilación de los extremos del ADN

Para realizar las ligaciones de fragmentos de ADN fue necesaria la desfosforilación previa de los extremos del plásmido sobre el que se iba a realizar la ligación, para evitar su religación y aumentar así la eficiencia de la misma. La desfosforilación del vector se realizó durante la digestión del mismo, con el fin de tenerlo linealizado y desfosforilado en un único paso. Para ello, durante la digestión se añadió 1 U de la enzima fosfatasa alcalina termosensible, TSAP (Promega, EE. UU.). Terminada la digestión, la mezcla de reacción se incubó durante 15 min a 74 °C para la inactivación de la enzima y finalmente se cargó en un gel de agarosa para su purificación.

3.2.1.6.3. Ligación de fragmentos de ADN

Los fragmentos de ADN obtenidos por PCR fueron introducidos en distintos plásmidos (3.1.4.) para su secuenciación o expresión. Para calcular la cantidad necesaria de inserto (producto de PCR) a añadir en la reacción de ligación se hizo uso de la siguiente ecuación:

$$\frac{ng \text{ de vector} \times Kb \text{ del inserto}}{Kb \text{ del vector}} \times (\text{proporción inserto:vector}) = ng \text{ de inserto}$$

Los vectores de clonación pSpark® II, pMBL-T y pJET1.2 se adquirieron en kits donde se incluían sus propios reactivos y ligasas. En estos casos las ligaciones se realizaron bajo las condiciones indicadas por cada fabricante.

- Para realizar ligaciones con el vector pSpark[®] II (Canvax Biotech, España) la mezcla de reacción contenía 20 ng de vector en el tampón suministrado por el kit de la ADN ligasa T4, 5 U de la enzima ADN ligasa T4, 5% (v/v) de PEG 6000, la cantidad necesaria de inserto purificado para tener una proporción 5:1 (inserto:vector) y agua destilada esterilizada hasta tener un volumen final de 10 µl. Las ligaciones se llevaron a cabo a 22 °C durante 1 h.

Este vector permite las clonaciones de productos de PCR con extremos romos.

- Las ligaciones en el vector pMBL-T (Dominion, EE. UU.) se realizaron con 50 ng de vector en el tampón de reacción suministrado para la ADN ligasa T4, 5 U de la enzima ADN ligasa T4, la cantidad necesaria de inserto purificado para tener una proporción 5:1 (inserto:vector) y agua destilada esterilizada hasta tener un volumen final de 10 µl. Las ligaciones se llevaron a cabo a 22 °C durante 1 h.

Como se explicó en el apartado 3.2.1.4.3., los insertos usados para ligar en este vector, tienen que ser productos de PCR que hayan sido amplificados con polimerasas, como la *i-TaqTM DNA Polymerase* (Intron Biotechnology, Corea), que añadan adenina a los extremos 3' de los fragmentos. En caso contrario, antes de realizar la ligación hubo que adenilar el inserto.

- Las ligaciones de productos de PCR con extremos romos en el vector de clonación pJET1.2 (Thermo Fisher Scientific, EE. UU.) se realizaron en un volumen final de 20 µl, conteniendo 50 ng de vector en el tampón de reacción, 5 U de la enzima ADN ligasa T4, la cantidad necesaria de inserto purificado para tener una proporción 3:1 (inserto:vector) y agua destilada esterilizada. Las ligaciones se llevaron a cabo a 22 °C durante 5 min.

Para llevar a cabo ligaciones de productos de PCR amplificados con la enzima *i-TaqTM DNA Polymerase* (Intron Biotechnology, Corea) en este vector fue necesario realizar previamente una reacción para conseguir extremos romos (*blunting reaction*). Esta reacción se llevó a cabo en un volumen final de 18 µl de tampón de reacción conteniendo 1 µl de la enzima *DNA blunting*, 1 µl de producto de PCR no purificado o 0.15 pmol de producto de PCR purificado y agua destilada esterilizada. Esta mezcla se incubó a 70 °C durante 5 min y, a continuación, se enfrió en hielo. Terminada esta reacción se llevó a cabo la ligación a 22 °C, durante 5 min y añadiendo 50 ng de vector y 5 U de la enzima ADN ligasa T4.

A diferencia de los vectores de clonación, los vectores de expresión, pYES2, p416GPD, p423GPD y pBIN19::35S se encuentran circularizados. Por ello, en estos casos, antes de realizar las ligaciones, se tuvieron que generar extremos cohesivos compatibles mediante restricciones de los insertos y de los plásmidos. Las ligaciones se realizaron a 22 °C durante 2 h, en una mezcla de reacción que contenía el tampón de la ligasa T4 (Thermo Fisher Scientific, EE. UU.), 50 ng del producto purificado de la digestión del plásmido, 1 U de ligasa T4 (Thermo Fisher Scientific, EE. UU.), la cantidad apropiada del producto purificado de la digestión del inserto para tener una proporción 5:1 (inserto:vector) y agua destilada esterilizada hasta tener un volumen final de 10 µl.

3.2.1.7. Secuenciación del ADN

La secuenciación de los genes o fragmentos clonados se llevó a cabo en los laboratorios Secugen, S.A. (España), empleando oligonucleótidos diseñados a partir de las regiones flanqueantes al MCS del vector. Las secuencias de estos oligonucleótidos vienen detalladas en el Anexo I. Gracias a la secuenciación, se comprobó no sólo la presencia de los insertos, sino también la correcta orientación de éstos en el vector.

3.2.1.8. Transformación génica

3.2.1.8.1. Transformación génica en *Escherichia coli*

A. Preparación de células competentes

El protocolo seguido para la preparación de células competentes de *E. coli* se basa en el descrito por Sambrook et al. (1989) con algunas modificaciones. Las células de *E. coli* se cultivaron en medio SOB sólido suplementado con tetraciclina, a 37 °C durante toda la noche. Al día siguiente, se tomaron entre 10 y 20 colonias para inocular 20 ml de medio SOB con tetraciclina y se incubó a 37 °C con agitación continua a 200 rpm durante la noche. Al día siguiente, se tomaron 4 ml de este preinóculo para inocular 200 ml de medio SOB con MgSO₄ y tetraciclina, precalentado a 37 °C en un matraz de 1 l estéril. El inóculo se incubó a 37 °C con agitación a 200 rpm hasta que la DO₆₀₀ fue de 0.48. Alcanzada esta DO₆₀₀, el crecimiento del cultivo se detuvo enfriándolo en agua-hielo durante 10 min, con breve agitación inicial. Pasados los 10 min, las células se recogieron por centrifugación a 1500 x g durante 10 min a 4 °C, se descartó el sobrenadante, las células se resuspendieron en 120 ml de disolución TJNI fría (3.1.5.2.) y se incubaron en agua-hielo durante 15 min. Posteriormente, se recogieron las células por centrifugación a 1500 x g durante 10 min a 4 °C, se descartó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 16 ml de solución TJNIII fría (3.15.2.), dejándolas en agua-hielo durante 15 min. Por último, se prepararon alícuotas de 100 µl que se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se conservaron a -80 °C.

B. Transformación mediante choque térmico

El protocolo que seguido para la transformación de células competentes de *E. coli* es una modificación del descrito por Sambrook et al. (1989). Se descongelaron en hielo 100 µl de células competentes de *E. coli* y se añadieron 5 µl de la mezcla de ligación, o 10 µl si la ligación se realizó en el vector pJET1.2. La mezcla se incubó durante 30 min en hielo, para permitir que los plásmidos adhirieran a las paredes celulares bacterianas, tras lo cual, se sometió a un choque térmico a 42 °C durante 90 s y posteriormente se mantuvo durante 3 min en hielo, con el fin de introducir el ADN en las células durante la desestabilización inducida a las membranas. A continuación, se añadieron 800 µl de medio LB (3.1.4.1.1.) y se incubó durante 1 h a 37 °C con agitación a 200 rpm, para permitir la recuperación celular. Transcurrido este tiempo, se centrifugó a 11000 x g, se eliminó la mayor parte del sobrenadante y con el restante, aproximadamente 100 µl, se resuspendió el pellet y se sembró en placas de Petri con medio selectivo adecuado según el vector usado en la transformación:

- Las células transformadas con pMBL-T o pSpark® II (3.1.4.) se sembraron en placas de Petri con medio LB sólido suplementado con ampicilina, IPTG y X-Gal (3.1.4.1.1.).
- Las células transformadas con pYES2, p416GPD, p423GPD o pJET1.2 (3.1.4.) se sembraron en placas de Petri con medio LB sólido suplementado con ampicilina (3.1.4.1.1.).

En todos los casos, las placas se incubaron de 12 a 16 h a 37 °C.

C. Comprobación de transformantes

La presencia y orientación del inserto en el vector tras el proceso de transformación se comprobó mediante varios procesos secuenciales:

- Cribado azul/blanco mediante X-Gal: En aquellos casos en los que la transformación se realizó con construcciones basadas en el vector pMBL-T o pSpark® II, los transformantes positivos, que incluían el inserto, se pudieron identificar por el color blanco de sus colonias (3.1.4.1.1.).

- PCR de colonias: En el caso de tener colonias suficientes, se analizaron un total de 10 a 30 colonias por transformación mediante PCR de colonias (3.2.1.4.4.). Tras el análisis de los resultados mediante electroforesis del producto de PCR en gel de agarosa, cada colonia positiva se usó para inocular 3 ml de medio LB líquido con ampicilina y se creció entre 12 y 16 h a 37 °C con agitación continua a 200 rpm para la posterior obtención del ADN plasmídico.
- Digestión del plásmido clonado: Tras la obtención del ADN plasmídico se llevó a cabo la digestión del mismo (3.2.1.6.1.) para complementar, junto con la PCR de colonias, la selección de los transformantes positivos y la orientación del inserto. Las endonucleasas de restricción se eligieron teniendo en cuenta el vector y el inserto. El resultado de la digestión fue visualizado en un gel de agarosa y una vez confirmada la presencia y orientación del inserto en el plásmido, este se mandó a secuenciar.

3.2.1.8.2. Transformación génica en *Saccharomyces cerevisiae*

A. Transformación mediante acetato de litio-PEG

Para la transformación de levaduras nos basamos en el método descrito por Elble (1992). Este método permite una eficiente transformación de las levaduras independientemente de la fase de crecimiento del cultivo y sin necesidad de preparar previamente células competentes.

En primer lugar, se inocularon 10 ml de medio YPD conteniendo un 2% (p/v) de glucosa con una colonia aislada de la estirpe de *S. cerevisiae* a transformar y se incubó, durante toda la noche, a 30 °C con agitación continua a 200 rpm. En el caso concreto de la levadura FBY4137, en lugar de glucosa, el medio YPD se suplementó con un 2% (p/v) de galactosa para inducir la expresión del gen SLC1, controlada por el promotor *GALI*, inducible por galactosa, y evitar así la letalidad de la levadura. Al día siguiente, se centrifugó una alícuota de 800 µl de cultivo durante 1 min a 16000 x g, descartándose el sobrenadante. El precipitado celular se mezcló con 20 µg de ADN de esperma de salmón (ADN portador) previamente desnaturalizado, por incubación a 100 °C durante 15 min, y de 0.1 a 1 µg del ADN plasmídico. La mezcla se agitó brevemente en un vórtex (IKA®, Alemania), se añadieron 500 µl de tampón *plate*, se volvió a agitar y se incubó a temperatura ambiente entre 20 y 48 h. Al día siguiente, se centrifugó durante 1 min a 16000 x g, se eliminó el sobrenadante y se lavó con 500 µl de agua destilada estéril, resuspendiendo con ayuda de una pipeta, centrifugando nuevamente durante 1 min y eliminando el sobrenadante. Con la ayuda de una pipeta, se resuspendieron las células con 100 µl de agua destilada estéril y se sembraron en una placa de Petri con el medio mínimo selectivo adecuado en función del vector y de la estirpe de levadura usada. Las placas se incubaron a 30 °C entre 48 y 72 h boca abajo. Una vez crecidas, se tomaron entre 3 y 8 colonias aisladas, se sembraron en una nueva placa de Petri con el mismo medio y se incubaron a 30 °C durante el tiempo necesario, de 24 a 72 h, para producir una cantidad suficiente de biomasa con la que inocular cultivos posteriores.

B. Comprobación de transformantes

Para comprobar la presencia del vector y el inserto en las células transformadas se realizó una PCR de colonias (3.2.1.4.4.).

3.2.1.8.3. Transformación génica de *Agrobacterium tumefaciens*

A. Producción de células competentes de *Agrobacterium tumefaciens*

El método seguido para la preparación de células competentes de *A. tumefaciens* fue el descrito por An et al. (1988). Se incubaron células de *A. tumefaciens* en medio LB sólido con gentamicina y rifampicina (3.1.4.1.2), a 28 °C durante una noche. Al día siguiente, se tomó biomasa de una colonia aislada para inocular 5 ml del mismo medio pero líquido y se incubó a 28 °C con agitación a 200 rpm. Transcurridas aproximadamente 16 h, se añadieron 2 ml del

preinóculo a 50 ml del mismo y se incubó, a 28 °C con agitación a 200 rpm, hasta que el cultivo adquiriese una OD₆₀₀ de 0.5 a 1.0. A continuación, se incubó en hielo durante 10 min y se centrifugó a 3000 x g durante 5 min a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 1 ml de una solución de CaCl₂ 20 mM previamente enfriada. Se prepararon alícuotas de 100 µl que se congelaron en nitrógeno líquido y se conservaron a -80 °C.

B. Transformación de células competentes de *Agrobacterium tumefaciens* por choque térmico

La transformación de *A. tumefaciens* se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito por An et al. (1988). Para ello, se tomó una alícuota de células competentes a las que se añadió 1 µg de ADN del plásmido apropiado. Tras descongelarse completamente la alícuota en hielo, se incubó a 37 °C durante 5 min. Una vez aplicado el choque térmico se añadió 1 ml de medio LB líquido sin antibióticos para incubarse durante 3 h a 28 °C en agitación de 200 rpm. Transcurrido ese tiempo, se centrifugó la muestra, se resuspendieron las células en 100 µl de medio LB y se sembraron en una placa con medio LB sólido suplementado con rifampicina, gentamicina y kanamicina (3.1.4.1.2.). La placa se incubó a 28 °C el tiempo necesario para obtener colonias aisladas.

C. Comprobación de transformantes

Para comprobar la presencia del vector y el inserto en las células transformadas se realizó una PCR de colonias (3.2.1.4.4.).

3.2.1.8.4. Transformación de *Arabidopsis thaliana*

A. Transformación de *Arabidopsis thaliana* por inmersión floral

Las plantas de *Arabidopsis* se transformaron siguiendo el método de inmersión floral descrito por (Clough y Bent, 1998; Zhang et al., 2006).

Antes de la transformación, se inocularon 5 ml de medio LB con gentamicina, rifampicina y kanamicina (3.1.4.1.2.) con biomasa de *A. tumefaciens* portando el vector pBIN19::35S con los correspondientes genes codificantes de *HaLPCAT* y se incubó a 28 °C con agitación continua a 200 rpm. Tras 48 h, se inocularon 200 ml de medio fresco con 1 ml del cultivo estacionario y se creció durante 24 h adicionales. Las células fueron entonces recolectadas por centrifugación a 5500 x g durante 10 min y resuspendidas en 400 ml de solución de infiltración (3.1.4.2.). La solución fue transferida a un vaso de precipitado y las flores se sumergieron en ella invirtiendo las macetas y aplicando agitación durante 3-5 s.

Posteriormente, las plantas se retiraron y se depositaron en una bandeja cubierta con un film de plástico transparente para mantener la humedad. Las plantas se mantuvieron 24 h en las condiciones de crecimiento normales (3.1.1.5.1.) pero en oscuridad. A continuación, se transfirieron a una cámara de cultivo, donde se crecieron durante 3-5 semanas más, hasta que las silicuas se secaron. Se recolectaron las semillas y se seleccionaron los transformantes positivos.

B. Selección de líneas transgénicas

Para la identificación y selección de las líneas transgénicas se llevó a cabo un método basado en cambios en el fotoperiodo y en el uso de antibiótico de selección (Harrison et al., 2006). Tras la esterilización (3.1.1.5.1.), las semillas transgénicas fueron resuspendidas en una solución, previamente calentada, de agar noble al 0.8% (p/v) y sembradas en placas de Petri con medio ½ MS con kanamicina (3.1.4.1.4.). Tras un periodo de estratificación de 2 días a 4 °C en oscuridad, las semillas se incubaron durante 6 h con luz a 22 °C, seguido de una incubación a 22 °C en oscuridad durante 2 días y una última incubación con luz durante 24 h. Tras este proceso de selección, las plántulas transformadas, con cotiledones verdes y expandidos, se distinguían fácilmente de las que no lo habían sido, que poseían cotiledones amarillentos y sin expandir.

Después de 8-10 días, las plántulas transgénicas se trasplantaron a macetas y se cultivaron las condiciones normales de crecimiento (3.1.1.5.1.), hasta obtener la siguiente generación de semillas.

C. Comprobación de la presencia y expresión de genes en las líneas transgénicas

Una vez seleccionadas las plantas transgénicas se confirmó la presencia del transgen y la expresión del mismo mediante PCR, en primer lugar a partir de ADNg extraído de hojas de acuerdo al método descrito en 3.2.1.1.2. y posteriormente a partir de ADNc preparado a partir del mismo tejido empleando el método descrito en el mismo apartado. Como control se usaron los oligonucleótidos específicos de la actina de *A. thaliana*. Los oligonucleótidos empleados en estas reacciones constan en el Anexo 1.

3.2.1.9. Expresión heteróloga de proteínas recombinantes en *Saccharomyces cerevisiae*

Se prepararon cultivos celulares a partir de biomasa procedente de una única colonia de levadura transformada con los genes de interés en un plásmido de expresión del tipo pYES2, p423GPD o p416GPD. El tipo de medio selectivo SC, el volumen de medio y el tiempo de incubación variaron en función del plásmido usado en la transformación de la levadura y de la finalidad del cultivo.

Las células transformadas con construcciones basadas en el plásmido pYES2, que contiene el promotor *GALI* para controlar la expresión de la proteína recombinante, se hicieron crecer en preinóculos de medio selectivo SC suplementado con un 2% (p/v) de rafinosa como fuente de carbono. El uso de rafinosa para crecer los cultivos hace más eficiente la posterior inducción, ya que a diferencia de la glucosa, que reprime fuertemente la expresión de la proteína recombinante controlada por dicho promotor, la rafinosa es un azúcar no represor (Giniger et al., 1985; West et al., 1984). A partir de estos preinóculos se prepararon cultivos a la densidad óptica (DO_{600}) deseada en el medio de inducción, medio selectivo SC suplementado con un 2% (p/v) de galactosa y un 1% (p/v) de rafinosa. La galactosa actúa como inductor del promotor *GALI* que permite la expresión de las proteínas recombinantes (Giniger et al., 1985).

Las células transformadas con construcciones basadas en los plásmidos p4XXGPD (Mumberg et al., 1995), que contienen el promotor constitutivo *GPD*, se hicieron crecer en preinóculos de medio selectivo SC suplementado con un 2% (p/v) de glucosa. Como excepción, el medio usado para crecer las células transformadas en la levadura FBY4137 se suplementó con un 2% (p/v) de galactosa para permitir la viabilidad de esta levadura al expresarse el gen *SLC1*. A partir de estos preinóculos se prepararon cultivos a la densidad óptica deseada en el mismo medio de cultivo.

Para calcular el volumen necesario de un preinóculo para inocular el siguiente cultivo a una densidad óptica dada, se hizo uso de la siguiente ecuación:

$$\text{Volumen de preinóculo (ml)} = \frac{\frac{DO_{600}}{\text{ml}} \text{ del cultivo} \times \text{Volumen de cultivo (ml)}}{\frac{DO_{600}}{\text{ml}} \text{ del preinóculo crecido}}$$

A continuación se detallan los medios de cultivo, los volúmenes de medio y los tiempos de incubación en cada caso. Todos los cultivos fueron incubados a 30 °C con agitación a 200 rpm y todas las centrifugaciones se realizaron a 3000 x g, durante 5 min y a temperatura ambiente.

Ensayos de actividad HaLPCAT in vitro

Las levaduras transformadas para el ensayo de actividad HaLPCAT se incubaron durante 3 días en preinóculos de medio SC-ura suplementado con un 2% (p/v) de rafinosa. Se tomó el volumen necesario de cada preinóculo para empezar la inducción a una DO_{600} de 0.4. Estas

alícuotas se centrifugaron y las células se resuspendieron en medio SC-ura suplementado con un 2% (p/v) de galactosa y un 1% (p/v) de rafinosa, para la inducción durante 24 h. Para ensayar la reacción directa la inducción se realizó en un volumen de 200 ml y para la ensayar la reacción inversa se realizó en 1 l. Transcurridas las 24 h de inducción, las células fueron recogidas para la preparación de microsomas (3.2.1.13.).

Ensayos de actividad HaPDCT in vitro

Los preinóculos se incubaron durante 3 días en medio SC-his suplementado con un 2% (p/v) de glucosa. Se tomaron alícuotas de estos cultivos, se centrifugaron y los pellets obtenidos se resuspendieron en 1 l del mismo medio. El volumen tomado de cada cultivo fue el necesario para que el inóculo quedase a una $DO_{600} = 0.4$. Estos inóculos se incubaron durante 20 h y, posteriormente, se recogieron las células para la preparación de la fracción microsomal de levaduras (3.2.1.13.).

Análisis de la composición de ácidos grasos in vivo

Los cultivos, en medio SC-ura-his suplementado con un 2% (p/v) de glucosa, se incubaron durante 24 h y, al día siguiente, se tomaron alícuotas de los mismos para preparar inóculos de $DO_{600} = 0.4$. Para el análisis de la composición total de ácidos grasos los inóculos se prepararon en 20 ml del mismo medio y para el análisis de la composición de ácidos grasos de distintas especies de lípidos se prepararon en 200 ml. Para ello, las alícuotas se centrifugaron y los pellets se resuspendieron en el volumen necesario de medio. Los cultivos se incubaron durante 48 h, para obtener cultivos celulares en fase estacionaria y posteriormente las células se recogieron para su análisis.

Análisis del conjunto de acil-CoAs

Se prepararon preinóculos en medio SC-ura-his suplementado con un 2% (p/v) de glucosa y se incubaron durante 24 h. Posteriormente, se tomó el volumen necesario de cada cultivo para preparar inóculos de $DO_{600} = 0.1$, centrifugando las alícuotas y resuspendiendo los pellets en 20 ml del mismo medio. Los inóculos se incubaron durante 3 días y, coincidiendo con su fase estacionaria, las células se recogieron para su análisis.

Ensayo de complementación con liso-PAF

Para realizar este ensayo, se prepararon cultivos de levadura transformada en 10 ml de medio SC-ura suplementado con 2% (p/v) glucosa y se incubaron durante toda la noche. Al día siguiente, para inducir la expresión, estos cultivos se diluyeron a una DO_{600} de 0.4 en 10 ml de medio SC-ura con galactosa al 2% (p/v) y rafinosa al 1% (p/v), se incubaron durante 24 h y se procedió a realizar el ensayo de complementación.

Ensayo de complementación con 5-FOA

5 ml de cultivos de levadura transformada en medio SC-ura-his suplementado con 2% (p/v) de galactosa se hicieron crecer toda la noche. Al día siguiente, los cultivos se diluyeron a una DO_{600} de 0.4 en 20 ml del mismo medio y se incubaron otra noche más.

3.2.1.10. Ensayo de complementación con liso-PAF

El ensayo de complementación de la actividad LPCAT se llevó a cabo en base al estudio realizado por [Chen et al. \(2007\)](#) con algunas modificaciones en el protocolo. Este ensayo se realizó con cultivos de la levadura Y02431 transformada con las construcciones pYES2::*HaLPCAT1*, pYES2::*HaLPCAT2* y pYES2::*HaLPCAT3*. Como control negativo se usó la misma estirpe de levadura albergando el plásmido pYES2 vacío y como control positivo, la levadura S288C. Tras 24 h de incubación a 30 °C con agitación a 200 rpm en el medio de

inducción, estos cultivos se diluyeron en serie 1:10 desde una $DO_{600} = 2$ hasta una $DO_{600} = 2 \times 10^{-4}$. 10 μ l de cada una de estas diluciones se sembraron en tres placas de Petri con medio SC-ura con galactosa al 2% (p/v) y rafinosa al 1% (p/v), una de las placas se suplementó con 10 μ g/ml de liso-PAF, otra con 5 μ g/ml y otra no lo contenía. Las placas se incubaron a 30 °C durante 72 h.

3.2.1.11. Ensayo de complementación con 5-FOA

Los cultivos de la levadura FBY4137 que contiene la construcción pGREG546::ScSLC1 (marcador URA3) transformada con las construcciones de los genes *HaLPCAT* en el plásmido p423GPD (marcador HIS3) fueron diluidos en serie 1:10 de $DO_{600} = 0.4$ a $DO_{600} = 0.4 \times 10^{-4}$ y 10 μ l de cada dilución se sembraron en una placa SC-his con glucosa al 2% (p/v) y 5-FOA al 1% (p/v). La levadura albergando el vector vacío se usó como control negativo y la levadura transformada con el gen *HaLPAAT2* en p423GPD se usó como control positivo. Además, como control, 10 μ l de cada dilución se sembraron en una placa SC-ura-his con galactosa al 2% (p/v). Las placas se incubaron a 30 °C durante 72 h.

3.2.1.12. Obtención de la fracción microsomal de levadura

Para la preparación de la fracción microsomal de levadura, se recogieron las células de los cultivos inducidos, en alícuotas de 100 ml, mediante centrifugación a 3000 x g durante 5 min a 4 °C. A continuación, para eliminar los restos de medio de cultivo se lavaron primero con agua destilada y después con tampón de lisis (3.1.4.3.). El precipitado celular lavado se resuspendió en 1 ml del mismo tampón de lisis y con 10 μ l de cóctel inhibidor de proteasas de levaduras y hongos (Sigma-Aldrich, EE. UU.). Se añadieron 500 μ l de bolas de vidrio de 710 a 1180 μ m (Sigma- Aldrich, EE. UU.) y se procedió a romper mecánicamente las células, mediante seis ciclos de rotura consistentes en 1 min y 30 s de lisis en un homogeneizador *MiniBeadbeater-8* (BioSpec, EE. UU.) a máxima velocidad, colocándose posteriormente durante 1 min en hielo para evitar sobrecalentamiento. A continuación, las muestras se centrifugaron en una microcentrífuga *Spectrafuge 24D* (Labnet, EE. UU.) a 10000 x g durante 20 min a 4 °C. El sobrenadante se volvió a centrifugar a 100000 x g durante 1 h y 10 min a 4 °C en una ultracentrífuga *Optima MAX Ultracentrifuge* (Beckman Coulter™, EE. UU.). La fracción microsomal obtenida se resuspendió en tampón de mantenimiento (3.1.4.3.) y, seguidamente, se midió la concentración proteica mediante el método BCA (Smith et al., 1985). Finalmente, se prepararon alícuotas que se congelaron con N₂ líquido y se conservaron a -80 °C para su posterior uso en ensayos enzimáticos.

3.2.1.13. Cuantificación de proteínas microsomales

La concentración de las proteínas microsomales se determinó por triplicado mediante el método descrito por Smith et al. (1985), usando el kit comercial *Pierce™ BCA Protein Assay Kit* (Thermo-Fisher, EE. UU.) y BSA como estándar para obtener las curvas patrón. Tras añadir el reactivo de proteínas del kit a la muestra o al estándar, se incubó durante 30 min a 37°C y, a continuación, se determinó la absorbancia a 562 nm en un espectrofotómetro *Multiskan Spectrum* (Thermo Fisher Scientific, EE. UU.).

3.2.1.14. Medidas de densidad óptica de cultivos (DO_{600})

El crecimiento de cultivos bacterianos y de levaduras se determinó midiendo la absorbancia a 600 nm en un espectrofotómetro *Ultrospec 3300 pro* (Amersham-Biosciences, EE. UU.). Para estandarizar las medidas se determinó previamente la absorbancia de los correspondientes blancos.

3.2.1.15. Análisis informático de secuencias de ADN y proteínas

El diseño de los oligonucleótidos y el análisis de los mismos se llevaron a cabo haciendo uso de la herramienta *NetPrimer* (Premier Biosoft, EE. UU.; <http://www.premierbiosoft.com>).

Las secuencias obtenidas de los genes o fragmentos clonados tras la secuenciación fueron visualizadas mediante el programa *Bioedit Sequence Alignment Editor* (Hall, 1999).

Las búsquedas de secuencias, tanto aminoacídicas como nucleotídicas, homólogas a una secuencia dada se realizaron en la base de datos del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (*National Center for Biotechnology Information*, NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) haciendo uso del programa informático de alineamiento de secuencias BLAST 2.0 (*Basic Local Alignment Search Tools*; Altschul et al., 1990). Los algoritmos de búsqueda variaron en función de si se buscaban secuencias nucleotídicas o aminoacídicas y de si se partía de una secuencia nucleotídica o aminoacídica. Los algoritmos de búsqueda usados fueron: *tblastn*, que ofrece secuencias de nucleótidos traducidos homólogas a una secuencia aminoacídica dada; *blastp*, que ofrece secuencias aminoacídicas homólogas a una secuencia aminoacídica dada; *blastx*, que ofrece secuencias proteicas homólogas a una secuencia de nucleótidos traducida y *blastn* que ofrece secuencias de nucleótidos homólogas a una secuencia nucleotídica dada. La búsqueda de secuencias, también se llevó a cabo en la base de datos del genoma del girasol (<https://www.sunflowergenome.org>).

La base de datos de dominios conservados (*Conserved Domain Database*, CDD; Marchler-Bauer y Bryant, 2004; Marchler-Bauer et al., 2011, 2015 y 2017), que forma parte del sistema de búsqueda del programa BLAST 2.0 del servidor del NCBI, permitió identificar las distintas proteínas como pertenecientes a una superfamilia conocida.

Los alineamientos de secuencias nucleotídicas o aminoacídicas se llevaron a cabo a utilizando el programa informático *ClustalX* v2.0.10 (Larkin et al., 2007) y para realizar posteriores modificaciones sobre dichos alineamientos se usó del programa *Bioedit Sequence Alignment Editor* (Hall, 1999).

El programa *NEBcutter V2.0* (Vincze et al., 2003) permitió realizar mapas de digestión, tanto de los genes a clonar como de los vectores de expresión.

El portal de recursos bioinformáticos ExPASy (*Expert Protein Analysis System*, <http://www.expasy.org/tools/>) desarrollado por el Instituto Suizo de Bioinformática (SIB, *Swiss Institute of Bioinformatics*) aportó numerosas herramientas como *translate tool*, que permitió llevar a cabo la traducción de nucleótidos a aminoácidos y la búsqueda del marco abierto de lectura (ORF, *Open Reading Frame*) de las diferentes secuencias clonadas; *TopPred II* (von Heijne, 1992; Claros y von Heijne, 1994) que, haciendo uso de la escala de hidrofobicidad KD (Kyte y Doolittle, 1982), permitió predecir α -hélices y la topología de las proteínas de membrana y *ProtParam tool* (Gasteiger et al., 2005), gracias al cual se pudieron estimar distintos parámetros físico-químicos de las proteínas.

Para predecir las localizaciones subcelulares de las proteínas se usó el programa *DeepLoc* (Almagro-Armenteros et al., 2017) del Centro para el Análisis de Secuencias Biológicas (CBS, *Center for Biological Sequence Analysis*) de la Universidad Técnica de Dinamarca.

Los análisis filogenéticos se realizaron mediante una búsqueda previa de secuencias de proteínas homólogas de otras especies de plantas depositadas en la base de datos del NCBI usando el algoritmo de búsqueda *blastp*, que ofrece secuencias aminoacídica homólogas a una

secuencia aminoacídica dada. Con los resultados obtenidos se realizó un alineamiento con el programa *ClustalX* v2.0.10 (Larkin et al., 2007) y, en base a este alineamiento, se generó un árbol filogenético usando el programa *MEGA6* (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*; Tamura et al., 2013) utilizando para ello el método *Neighbor-Joining*.

3.2.2. MÉTODOS ANALÍTICOS Y BIOQUÍMICOS

3.2.2.1. Análisis de la composición de ácidos grasos de levadura

3.2.2.1.1. Preparación de la muestra

Se tomaron alícuotas de cultivos celulares en fase estacionaria (3.2.1.10.) diluidas de manera que todas poseyeran la misma densidad óptica que la del cultivo que menos había crecido, DO_{600} de 1.81 para las muestras procedentes de levaduras transformadas con *HaPDCT* y DO_{600} de 4.00 para las muestras procedentes de levaduras transformadas con *HaLPCAT*. Estas alícuotas se centrifugaron a 3000 rpm durante 5 min a temperatura ambiente y, para eliminar los restos del medio de cultivo, se lavaron dos veces con agua estéril, centrifugando para ello a 3000 rpm durante 5 min.

Las muestras procedentes de levaduras transformadas con *HaPDCT* se dejaron secar en un termobloque a 40 °C bajo atmósfera de nitrógeno durante 1 h y, posteriormente, se obtuvieron los ésteres metílicos de ácidos grasos (FAMES, *Fatty Acid Methyl Esters*) (3.2.2.1.5.), que se analizaron mediante cromatografía de gases (3.2.2.1.6.).

Con las muestras procedentes de levaduras transformadas con *HaLPCAT*, se procedió a la extracción de los lípidos totales de las levaduras (3.2.2.1.2.). A continuación, se separaron las distintas especies de lípidos (PC, PE y TAG) mediante cromatografía en capa fina (TLC) (3.2.2.1.4.) y se obtuvieron los FAMES de cada una de estas fracciones lipídicas (3.2.2.1.5.), que se analizaron mediante cromatografía de gases (3.2.2.1.6.). Además, a partir de los lípidos totales de estas muestras, se procedió a separar mediante extracción en fase sólida (3.2.2.1.3.) distintas fracciones lipídicas (lípidos neutros y polares) para su cuantificación por HPLC (3.2.2.4.).

3.2.2.1.2. Extracción de lípidos totales de levadura

Se añadieron a las muestras (3.2.2.1.1.) 2 ml de CH_3OH y 1 ml de bolas de vidrio de 710 a 1180 μm (Sigma- Aldrich, EE. UU.) y se agitó a máxima velocidad en un vórtex (IKA®, Alemania) durante 10 min. Transcurridos los 10 min de agitación, se añadieron a las muestras 4 ml de $CHCl_3$ y 1 ml de NaCl 0.9% (p/v), se volvió a agitar la muestra vigorosamente durante 30 s y se centrifugó a 2500 rpm durante 2 min. La fase inferior se traspasó a un tubo tarado. A continuación, se volvieron a añadir a las muestras otros 2 ml de $CHCl_3$, se agitó vigorosamente durante 30 s y se centrifugó a 2500 rpm durante 2 min. La fase inferior se unificó con la fase inferior de la primera extracción. Se repitió la extracción con otros 2 ml de $CHCl_3$. Finalmente, se añadió 1 ml CH_3OH y 500 μl de NaCl 0.9% (p/v) al tubo que contenía los 8 ml de $CHCl_3$, se agitó vigorosamente durante 30 s, se centrifugó a 2500 rpm durante 2 min y se eliminó la fase superior con una pipeta.

La fase lipídica se evaporó bajo atmósfera de nitrógeno, en un termobloque a 40 °C, se pesaron los tubos y se disolvieron los lípidos en 1 ml de $CHCl_3$. Las muestras se conservaron en un vial cerrado con atmósfera de nitrógeno a -20 °C.

3.2.2.1.3. Separación de lípidos neutros y polares mediante extracción en fase sólida

La separación de los lípidos neutros y polares se llevó a cabo mediante extracción en fase sólida. Para ello, 250 μl de la muestra de lípidos totales (3.2.2.1.2.) se cargaron en un cartucho

(0.5 g *silica gel cartridge LiChrolut®*; Merck, Alemania) equilibrado previamente con 2 ml de cloroformo. Una vez cargada la muestra, se eluyeron los lípidos neutros con 10 ml cloroformo y, a continuación, los lípidos polares con 10 ml de metanol. Por último, se evaporó el solvente de cada muestra y los lípidos se resuspendieron en 1 ml de disolvente, hexano para los lípidos neutros y hexano:2-propanol (3:2, v/v) para los lípidos polares. Para cuantificar las distintas clases de lípidos, ambas muestras fueron analizadas posteriormente mediante HPLC (3.2.2.4.).

3.2.2.1.4. Separación de distintas especies de lípidos de levadura mediante TLC

La separación de las distintas especies de lípidos de levadura se llevó a cabo mediante TLC siguiendo un desarrollo doble (3.2.2.3.). Para ello se cargaron 200 µl de la muestra de lípidos totales (3.2.2.1.2.) y patrones de TAG, PC y PE. El primer desarrollo se llevó a cabo en éter/hexano/ácido acético (60:40:1, v/v/v) y se realizó hasta que el frente llegó a unos 2 cm del límite superior de la placa. Al terminar el primer desarrollo se marcó con yodo la banda correspondiente al patrón de DAG y se llevó a cabo un segundo desarrollo en cloroformo/metanol/ácido acético/agua (85:15:10:2.5, v/v/v/v), hasta que el frente llegó justo por debajo de la banda correspondiente a los DAG. Posteriormente, tras visualizar las bandas correspondientes a los patrones, se rasparon, con ayuda de una espátula, las bandas de interés, introduciendo la sílice en tubos de vidrio para su posterior metilación.

3.2.2.1.5. Obtención de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAMES)

Para determinar la composición en ácidos grasos de las muestras mediante cromatografía de gases fue necesario obtener previamente sus FAMES, con la finalidad de conseguir compuestos de mayor volatilidad.

Las muestras de partida fueron o distintas especies de lípidos de levadura separadas mediante TLC (sílice) o material biológico sin pretratamiento (3.2.2.1.1). En ambos casos, los FAMES se obtuvieron mediante una reacción de transesterificación con metanol en medio ácido, añadiéndoles a las muestras 3 ml de mezcla de metilar, si bien, para el material biológico sin pretratamiento se usó mezcla de metilar que contenía dimetoxipropano y para el resto de muestras se usó mezcla de metilar sin dimetoxipropano (3.1.5.3.). Las mezclas se incubaron a 80 °C durante 1 h. Posteriormente, se añadieron 3 ml de hexano, se agitó vigorosamente y se centrifugó a 2500 rpm durante 5 min para separar las fases. La fase superior, que contenía los ésteres metílicos, se pasó a otro tubo, se evaporó el hexano bajo corriente de nitrógeno y la muestra se disolvió en 100 µl heptano.

3.2.2.1.6. Separación de ésteres metílicos (FAMES) mediante cromatografía de gases

Una vez obtenidos los ésteres metílicos, estos se separaron mediante cromatografía de gases en un cromatógrafo *Agilent 6890 Series Gas Chromatograph* (Agilent Technologies, EE. UU.), equipado con un detector de ionización de llama (FID, *Flame Ionization Detector*) y con una columna capilar de sílice fundida SPTM-2380 de 30 m de longitud, 0.25 mm de diámetro interno y 0.2 µm de espesor de fase.

Las condiciones del análisis fueron: temperatura del inyector, 220 °C, temperatura del detector, 250 °C. Programación del horno: temperatura de inicio 150 °C, manteniéndose 2 min y una rampa de temperatura de 4 °C/min hasta 220 °C, manteniéndose 2.5 min. Como gas portador (*carrier gas*) se empleó hidrógeno con un flujo de 40 ml/min y el sistema de inyección en modo *split*, con una razón de división de la muestra de 1:20. El tiempo de análisis para cada muestra fue de 22 min.

La identificación de los picos cromatográficos correspondientes a los ácidos grasos se determinó por comparación con patrones conocidos.

3.2.2.2. Extracción de acil-CoAs y formación de acil-eteno-CoA fluorescentes

La extracción y el análisis del conjunto de acil-CoAs de levaduras se llevaron a cabo según el protocolo descrito Larson y Graham (2001).

Para realizar el análisis, se tomaron distintas alícuotas de los cultivos (3.2.1.10.) y se diluyeron convenientemente para alcanzar la misma DO_{600} que la del cultivo que menos había crecido, en este caso, $DO_{600} = 1.60$. Las células se recogieron por centrifugación a $3500 \times g$ durante 5 min a temperatura ambiente, se eliminó el sobrenadante y se añadió 1 nmol de heptadecanoil-CoA (17:0-CoA) (Avanti Polar Lipids, EE. UU.) como patrón interno, 200 μ l de tampón de extracción (3.1.5.3.) y 500 μ l de bolas de vidrio de 710 a 1180 μ m (Sigma- Aldrich, EE. UU.). La mezcla se agitó durante 2 min a máxima velocidad en un vórtex (IKA®, Alemania). Para eliminar los lípidos y pigmentos el extracto se lavó tres veces con 200 μ l de una mezcla de hexano saturado con 2-propanol/agua (1:1, v/v), separando las fases por centrifugación durante 2 min a $100 \times g$ y descartando el sobrenadante. Tras el último lavado, se añadieron 5 μ l de agua saturada en $(NH_4)_2SO_4$ y 600 μ l de metanol/cloroformo (2:1, v/v). La mezcla se agitó brevemente en un vórtex (IKA®, Alemania) y se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 20 min. A continuación, se centrifugó durante 2 min a $21000 \times g$. El sobrenadante acuoso se transfirió a un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml y fue llevado a sequedad por centrifugación a vacío a $40^\circ C$ en un sistema *SpeedVac*, durante aproximadamente 3 h. Una vez seco, el residuo fue resuspendido en 150 μ l de agua y 150 μ l de reactivo cloroacetaldehído 2X (3.1.5.3) y finalmente, para la formación de los derivados fluorescentes de los acil-CoA, se llevó a cabo la reacción de derivatización a $85^\circ C$ durante 20 min. La reacción se llevó a cabo en oscuridad puesto que el reactivo es sensible a la luz. Los acil-eteno-CoA fluorescentes obtenidos se analizaron por HPLC (3.2.2.4.)

3.2.2.3. Cromatografía en capa fina (TLC)

Aproximadamente 1 h antes del desarrollo cromatográfico, el eluyente se introdujo en la cubeta cromatográfica para conseguir el equilibrio entre las fases líquido y vapor (saturación de la atmósfera) y, como mínimo 30 min antes, las placas (placas de vidrio de 20x20 cm y 0.25 mm de grosor; Merck, Alemania) se activaron a $80^\circ C$ para eliminar la humedad.

Las mezclas a separar y los patrones, se disolvieron en un pequeño volumen de disolvente con un punto de ebullición bajo, para conseguir su evaporación tras la aplicación en la placa. Se cargaron a 3 cm del extremo inferior de la placa, esta se introdujo en la cámara cromatográfica y se dejó que el eluyente ascendiera por capilaridad.

En los desarrollos simples, se dejó ascender el eluyente hasta unos 2 cm del límite superior de la placa. En los desarrollos dobles, tras el primer desarrollo, se dejó secar la placa al aire, se señaló la altura a la que quedaban los distintos lípidos y se realizó el segundo desarrollo. En este segundo desarrollo, el eluyente se dejó ascender hasta la mitad de la placa, para no interferir con los lípidos que en el primer desarrollo se habían desplazado con un mayor R_f (valor del desplazamiento del compuesto dividido por el desplazamiento del disolvente).

Para visualizar las bandas lipídicas se usó vapor de yodo, que tiñe las muestras al unirse por fuerzas de tipo *Van der Waals* a las cadenas carbonadas. Para ello, la placa se introdujo en una cámara de revelado que contenía yodo sólido en equilibrio con su vapor. Las bandas correspondientes a cada especie lipídica se identificaron comparando su R_f con los de patrones conocidos. En el caso de que se quisieran visualizar solo las bandas correspondientes a los patrones, se usó una pipeta Pasteur con yodo sólido, tras la que se hizo pasar aire que se enfocó únicamente a la zona de la placa que se deseaba marcar. Tras revelarse las bandas, estas se marcaron con lápiz y la placa se dejó en una campana de extracción a temperatura ambiente para eliminar el yodo. Por último, las bandas de interés se rasparon con ayuda de una espátula y los lípidos se eluyeron con el disolvente apropiado. En el caso concreto de los desarrollos

cromatográficos realizados en los ensayos de actividad con sustratos radiactivos, la sílice raspada se introdujo directamente en un tubo del contador de centelleo líquido para cuantificar su radiactividad.

3.2.2.4. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Para realizar los análisis de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, *high performance liquid chromatography*) se hizo uso de un equipo HPLC 2695 (Waters, EE. UU.) y los datos se procesaron mediante el programa *Empower* suministrado por el fabricante del aparato.

La cuantificación de los lípidos neutros (3.2.2.1.3. y 3.2.2.5.1.) se llevó a cabo con una columna de fase directa *Lichrosorb* (4.6 x 250 mm, 5.0 μm ; Merck, Alemania) y empleándose un detector de luz difusa (*evaporative light scattering detector*) ELSD 2420 (Waters, EE.UU.). El sistema de análisis implicó la elución con un gradiente binario. El solvente A consistió en hexano al 0.1% de ácido acético. El solvente B en una mezcla hexano/2-propanol/acetato de etilo 80:20:20 (v/v/v) al 0.1% de ácido acético. La columna se equilibró con una relación de solventes A/B 98:2 (v/v), y al realizar la inyección el contenido de B se incrementó hasta el 70% durante 15 min, para re-equilibrar posteriormente la misma a la composición inicial durante 5 min. El flujo de trabajo fue de 2 ml/min. El sistema se calibró inyectando cantidades conocidas de distintos patrones adquiridos de Sigma-Aldrich (EE. UU.).

La cuantificación de los lípidos polares (3.2.2.1.3.) se llevó a cabo en una columna *Lichrospher 100 Diol* (254 x 4 mm, 5 μm ; Merck, Alemania) empleando el mismo detector mencionado anteriormente. El método seguido fue el descrito por [Salas et al. \(2006\)](#), en el cual se aplica un gradiente binario, siendo la fase A: hexano/2-propanol/ácido acético/trietilamina (TEA) 82:17:1:0.08 (v/v/v/v) y la B: 2-propanol/agua/ácido acético/TEA 85:14:1:0.08 (v/v/v/v). La columna se equilibró inicialmente con 90% de solvente A. Una vez se inyectó la muestra se aplicó un gradiente hasta un 60% de A en 24 min y se mantuvo un minuto a esa proporción de solventes. A continuación, la columna se reacondicionó con un 90% de A durante 9 min. El flujo de solvente fue de 1 ml/min y la temperatura de análisis 30°C.

Para analizar las muestras de acil-eteno-CoA fluorescentes (3.2.2.2.) se usó una columna *XBridge C18* (250 x 5 mm, 5 μm ; Waters, EE. UU.) y un detector de fluorescencia *Multi λ Fluorescence Detector 2475*; Waters, EE. UU.) usando el sistema de gradiente cuaternario publicado por [Larson y Graham \(2001\)](#).

El flujo de la fase móvil en la columna fue de 0.75 ml/min y la temperatura de 40 °C. La composición de la fase móvil fue: A, ácido acético al 1% (v/v); B, acetonitrilo al 90% (v/v) y ácido acético al 1% (v/v); C, TEA al 0.25% (v/v) y tetrahidrofurano (THF) al 0.1% (v/v); D, acetonitrilo al 90% (v/v). El gradiente de elución fue el siguiente: 0-7 min, (90% (v/v) A y 10% (v/v) B a 20% (v/v) A y 80% (v/v) B); 7.0-7.1 min, (20% (v/v) A y 80% (v/v) B a 20% (v/v) A y 80% (v/v) C); 7.1-9.0min, (20% (v/v) A y 80% (v/v) C a 90% (v/v)C y 10% (v/v) D); 9-34 min, (90% (v/v) C y 10% (v/v) D a 25% (v/v) C y 75% (v/v) D); 34-35 min, (25% (v/v) C y 75% (v/v) D a 100% (v/v) D); 35-39 min, (100% (v/v) D a 100% (v/v) D); 39-40 min, (100% (v/v) D a 90% (v/v) A y 10% (v/v) B); 40-45 min, (90% (v/v) A y 10% (v/v) B). Los derivados fueron detectados con una longitud de onda de excitación de 230 nm y una de emisión de 420 nm.

La cuantificación se llevó a cabo en función del patrón interno, 17:0-CoA (Avanti Polar Lipids, EE. UU.).

3.2.2.5. Síntesis de reactivos

3.2.2.5.1. Síntesis de *sn*-1,2-18:2-DAG (*sn*-1,2-dilinoleína)

La síntesis de *sn*-1,2-18:2-DAG se realizó mediante la hidrólisis de *sn*-1,2,3-18:2-TAG (Sigma-Aldrich, EE. UU.) con lipasa pancreática del mismo suministrador. Para ello se añadieron a un tubo 50 mg de TAG, 10 mg de lipasa y 1 ml de tampón Tris-HCl pH 8.0. La mezcla se agitó enérgicamente y se calentó a 40 °C en un termobloque. A continuación, se añadieron 250 µl de una disolución de sales biliares (Sigma-Aldrich, EE. UU.; 3.1.5.3.) y 100 µl de una disolución acuosa de CaCl₂ al 22% (p/v) y se agitó vigorosamente durante 2 min. Para parar la reacción se añadieron 500 µl de HCl 35% (v/v)/H₂O (1:1, v/v) y se agitó la mezcla. Una vez parada la reacción se añadieron 2 ml de éter etílico, se agitó suavemente para evitar que emulsione y se centrifugó a 90 rpm durante 1 min. La fase superior etérea, se pasó a un nuevo tubo y se procedió a la separación de los DAG por TLC, usando como líquido de desarrollo la mezcla hexano/éter etílico/ácido acético (60:40:1, v/v/v). Cuando el frente llegó a unos 2 cm del límite superior, se sacó la placa de la cubeta y se dejó secar al aire. Para localizar la banda de DAG de la muestra, se visualizó con vapor de yodo la banda correspondiente al patrón de DAG. La banda de DAG se raspó con ayuda de una espátula y se eluyó de la sílice con éter etílico. Por último la concentración de DAG obtenida se determinó por HPLC (3.2.2.4.)

3.2.2.5.2. Preparación de disoluciones de acil-CoAs

Para la caracterización enzimática de LPCAT se usaron sales de amonio de acil-CoA comerciales de Avanti Polar Lipids (EE. UU.). Para ello se prepararon disoluciones a una concentración aproximada de 1 nmol/µl en tampón acetato de sodio a pH 5.0 (3.1.5.3.). La concentración exacta de cada uno de estas disoluciones se determinó espectrofotométricamente a 260 nm, aplicando la ley de Beer-Lambert y usando como coeficiente de extinción molar (ϵ), 16400 M/cm.

3.2.2.5.3. Síntesis química de fosfolípidos radiactivos

Preparación de la mezcla de los ácidos grasos radiactivos y no radiactivos

Para llevar a cabo la síntesis de fosfolípidos radiactivos fue necesario preparar previamente mezclas de ácidos grasos radiactivos y no radiactivos para tener la radiactividad específica ($\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$) deseada en cada caso.

Así, para la síntesis de *sn*-1-18:1-*sn*-2-[¹⁴C]-18:1-PC, *sn*-1-18:1-*sn*-2-[¹⁴C]-18:2-PC y *sn*-1-18:1-*sn*-2-[¹⁴C]-18:3-PC, para realizar el ensayo de la actividad enzimática *Ha*LPCAT en su reacción inversa se prepararon 18:1, 18:2 y 18:3 a 2.5 $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$. En el caso de la síntesis de las mismas especies de PC para realizar el ensayo de actividad enzimática de *Ha*PDCT se prepararon 18:1, 18:2 y 18:3 a 11 $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$. Para la síntesis de *sn*-1-[¹⁴C]-18:1-LPC se preparó 18:1 a 1 $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$.

Para ello se diluyó en cloroformo el ácido graso no radiactivo a 10 mg/ml y una cantidad dada de dicha disolución se mezcló con el ácido graso radiactivo comercial correspondiente (*American Radiolabeled Chemicals*, EE. UU.) calculándose la proporción de ambos en base a la radiactividad específica del reactivo comercial, que solía ser entre 50 y 55 $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$.

Síntesis de fosfatidilcolina (PC) radiactiva

Los distintos tipos de PC radiactiva se sintetizaron siguiendo un protocolo adaptado al descrito por Kanda y Wells (1981). Para obtener un buen rendimiento fue necesario trabajar en condiciones anhidras, por lo que se tuvo especial cuidado en realizar la reacción bajo atmósfera de nitrógeno.

En un tubo de vidrio de 15 ml con tapón de rosca, conteniendo una barra magnética de agitación, se tomó el volumen necesario de la mezcla preparada previamente del ácido graso radiactivo y el mismo ácido graso no radiactivo y el solvente se evaporó hasta sequedad bajo corriente de N₂ a 50-80 °C. A continuación, para eliminar las trazas de agua, se disolvió el residuo en un volumen de 300 µl de benceno y éste se evaporó hasta sequedad, realizándose la operación dos veces consecutivas. Inmediatamente después, se cerró el tubo y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Una vez atemperado se añadieron, bajo corriente de N₂, 180 µl de anhídrido trifluoroacético (Sigma-Aldrich, EE. UU.), se cerró el tubo, se agitó durante 30 s en un vórtex (IKA®, Alemania) y se evaporó el anhídrido trifluoroacético a temperatura ambiente bajo corriente de N₂ durante 60 s.

En otro tubo se tomó el volumen necesario de *sn*-1-18:1-LPC (Avanti Polar Lipids, EE. UU.) disuelta en cloroformo/metanol (2:1, v/v) para tener una relación molar 1:5 (ácido graso: *sn*-1-18:1-LPC) y se evaporó el disolvente hasta sequedad a 50-80 °C bajo corriente de N₂. A continuación, se añadieron 300 µl de benceno, se evaporaron hasta sequedad y se repitió el proceso una vez más. Por último, se añadieron, bajo corriente de N₂, 300 µl de ácido trifluoroacético (Sigma-Aldrich, EE. UU.) e inmediatamente después, se cerró el tubo y se dejó enfriar a temperatura ambiente.

A continuación, se agregó el aceptor de acilo disuelto en ácido trifluoroacético al anhídrido de ácido graso bajo corriente de N₂. Se cerró el tubo y la mezcla se agitó en un vórtex (IKA®, Alemania) durante 5 min a temperatura ambiente. Transcurridos los 5 min, se evaporó el disolvente bajo nitrógeno y se añadieron 3.75 ml de metanol/cloroformo (2:1, v/v), 0.9 ml de ácido acético 0.15 M, 1.25 ml de cloroformo y 1.25 ml de agua, mezclando con agitación entre adiciones. Se centrifugó brevemente durante 2 min a 1000 rpm y la fase de cloroformo se llevó a un nuevo tubo de metilar. Seguidamente, se añadieron 2.5 ml de cloroformo a la fase superior, se agitó y se volvió a centrifugar. La fase de cloroformo se combinó con la anterior y se evaporaron. La muestra se disolvió en un volumen de 200 µl de cloroformo.

Finalmente, para purificar el producto de la reacción, el extracto orgánico se cargó junto con los patrones, *sn*-1-18:1-LPC (Avanti Polar Lipids, EE. UU.) y *sn*-1-18:1-*sn*-2-18:1-PC (Sigma-Aldrich, EE. UU.), en dos placas de TLC previamente activadas. Se realizó un desarrollo cromatográfico con cloroformo/metanol/ácido acético/agua (90:15:10:3, v/v/v/v) hasta unos 2 cm por debajo del borde superior de la placa. Las bandas correspondientes con los patrones fueron visualizadas en atmósfera de yodo y las zonas correspondientes a las bandas que contenían el PC sintetizado se marcaron tomando como referencia la altura de los patrones.

Las bandas de PC se rociaron con agua, se rasparon con ayuda de una espátula y se eluyeron juntas con metanol. Por último, se determinó la concentración del producto sintetizado midiendo la radiactividad con un contador de centelleo líquido.

Síntesis de lisofosfatidilcolina (LPC) radiactiva

La síntesis de *sn*-1-[¹⁴C]-18:1-LPC radiactiva se llevó a cabo siguiendo el mismo protocolo que se usó para la síntesis de PC con la salvedad de usar L- α -GPC (Sigma-Aldrich, EE. UU.) como donador de acilo en lugar de LPC.

3.2.2.6. Cuantificación de la radiactividad

Las medidas de radiactividad de los diferentes compuestos obtenidos durante el desarrollo de este trabajo se realizaron usando un contador de centelleo líquido LS6500 (Beckman Coulter™, EE. UU.). Para ello se introdujo la muestra en un vial de centelleo de polietileno, se añadieron 3 ml de líquido de centelleo *Ecoscint™ H* (National Diagnostics, EE. UU.), se agitó vigorosamente durante 1 min y se cuantificó la radiactividad durante 10 min. En los casos en los que la muestra estuviera disuelta, antes de añadir el líquido de centelleo, se evaporó el disolvente bajo atmósfera de nitrógeno.

3.2.2.7. Determinación de actividades enzimáticas

3.2.2.7.1. Determinación de la actividad enzimática *HaLPCAT*

Reacción directa

Las especificidades de las enzimas *HaLPCAT* se determinaron midiendo por triplicado la incorporación de diferentes sustratos acil-CoA (3.2.2.4.3.) en *sn*-1-18:1-LPC marcado radiactivamente (3.2.2.4.4.) usando preparaciones de membrana de la levadura Y02431 transformada con las construcciones de los genes *HaLPCAT* en el vector pYES2 (3.2.1.10.). El ensayo se realizó en base al protocolo descrito por Lager et al. (2013).

Las reacciones se llevaron a cabo a 30 °C, con agitación a 100 rpm y en un volumen final de 50 µl en tampón fosfato de potasio (3.1.5.3.) conteniendo 10 nmol *sn*-1-[¹⁴C]-18:1-LPC (1 µCi/µmol), 5 nmol del acil-CoA correspondiente y 0.4 µg de proteína microsomal para *HaLPCAT1* y *HaLPCAT2* o 20 µg de proteína microsomal para *HaLPCAT3*. Las reacciones comenzaron con la adición de las proteínas microsomales y se pararon añadiendo 170 µl de ácido acético 0.15 M y 500 µl de cloroformo/metanol (1:1, v/v). El tiempo de reacción fue de 4 min para *HaLPCAT1* y *HaLPCAT2* y de 20 min para *HaLPCAT3*.

Terminada la reacción, las fases se separaron por centrifugación a 6000 rpm durante 1 min. La fase orgánica inferior se transfirió a un tubo de metilar, se secó bajo nitrógeno gas y se resuspendió en 40 µl de cloroformo. El producto se aplicó sobre placa de TLC que se desarrolló en cloroformo/metanol/ácido fórmico (75:25:10, v/v/v). Las bandas radiactivas correspondientes a PC se visualizaron en un *Typhoon 9410* (Amersham Biosciences, Reino Unido), se rasparon y se analizaron en un contador de centelleo.

Además de estas reacciones, se llevaron a cabo reacciones a tiempo cero como control. Los valores de actividad obtenidos con estos controles negativos se restaron de los valores de los ensayos reales para calcular la actividad enzimática en cada caso.

Reacción inversa

Para medir la especificidad de acilo en la dirección inversa se realizó el ensayo con distintas especies de PC (*sn*-1-18:1-*sn*-2-[¹⁴C]-18:1-PC, *sn*-1-18:1-*sn*-2-[¹⁴C]-18:2-PC y *sn*-1-18:1-*sn*-2-[¹⁴C]-18:3-PC) marcadas radiactivamente a 2.5 µCi/µmol (3.2.2.4.4.). El ensayo se realizó en base al protocolo descrito por Lager et al. (2013).

El ensayo se llevó a cabo por triplicado con preparaciones de membrana de la levadura Y02431 transformada con las construcciones de los genes *HaLPCAT* en pYES2 (3.2.1.10.).

Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 100 µl de tampón fosfato de potasio (3.1.5.3.) conteniendo 0.2 µmol de la sal de litio de CoA, 10 nmol 18:1-CoA, 1 mg BSA, 9 nmol

del [^{14}C]-PC correspondiente y 45 μg de proteína microsomal liofilizada, a una temperatura de 30 $^{\circ}\text{C}$, durante 60 min y con agitación a 100 rpm.

Una vez transcurrido el tiempo de reacción, se añadieron 3.75 ml metanol/cloroformo (2:1, v/v), 0.8 ml de ácido acético 0.15 M, 100 μl de BSA (100 mg/ml en agua), 1.25 ml de cloroformo y 0.9 ml de agua, agitándose la mezcla vigorosamente. Tras centrifugar a 2500 rpm durante 6 min, la fase inferior orgánica se descartó. Se añadieron 0.5 ml de KOH 4 M a la fase superior y se calentó a 90 $^{\circ}\text{C}$ durante 15 min. Posteriormente, se añadieron 0.5 ml de HCl 6 M, 3.75 ml metanol/cloroformo (2:1, v/v), 3.75 ml de cloroformo y 1 ml agua. Tras otra centrifugación en las mismas condiciones, la fase orgánica se pasó a un tubo nuevo y una alícuota de la misma fue medida en un contador de centelleo líquido. También se llevaron a cabo reacciones a tiempo cero, que se restaron de los valores de los ensayos reales para calcular la actividad enzimática en cada caso.

3.2.2.7.2. Determinación de la actividad enzimática HaPDCT

El ensayo de actividad PDCT se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito por Wickramaratna et al. (2015) con algunas modificaciones.

La actividad HaPDCT se ensayó por triplicado con preparaciones de microsomas de la levadura HJ091 transformada con p423GPD::HaPDCT (3.2.1.10.) y se determinó como la cantidad de DAG radiactivo formado por unidad de tiempo y cantidad de proteína microsomal ensayada. El ensayo se realizó con distintas especies de DAG, *sn*-1,2-dioleína (Sigma-Aldrich, EE. UU.) y *sn*-1,2-dilinoleína (3.2.2.4.1.), y de PC, *sn*-1-18:1-*sn*-2-[^{14}C]-18:1-PC y *sn*-1-18:1-*sn*-2-[^{14}C]-18:2-PC (3.2.2.4.4.). Además, se llevaron a cabo reacciones a tiempo cero como control. Los valores de actividad obtenidos con estos controles negativos se restaron de los valores de los ensayos reales para calcular la actividad enzimática en cada caso.

Los sustratos de la reacción, 100 nmoles de DAG no radiactivo y 12.5 nmoles de *sn*-1-18:1-*sn*-2-[^{14}C]-acil-PC (11 $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$) se mezclaron e inmediatamente se secaron bajo nitrógeno. El residuo seco se resuspendió en 50 μl de tampón de reacción 4X (3.1.5.3.) con sonicación durante 20 min. Las reacciones, que se llevaron a cabo a 30 $^{\circ}\text{C}$ durante 1 h, comenzaron con la adición de 90 μg de proteínas microsomales en 150 μl tampón GTE (3.1.5.3.) y se pararon con 3 ml de cloroformo/etanol (2:1, v/v) y 1.5 ml de KCl 0.9% (p/v). Una vez parada la reacción, la mezcla se agitó en un vórtex (IKA®, Alemania) y las fases se separaron por centrifugación a 1500 rpm durante 2 min. La fase orgánica se llevó a un nuevo tubo de metilar, se secó bajo nitrógeno gas y se resuspendió en 160 μl de cloroformo.

A continuación, los lípidos se separaron mediante TLC aplicando un doble desarrollo. En las placas se cargaron, junto con las muestras, los patrones de TAG, DAG y PC. El primer desarrollo se realizó hasta que el frente llegó a unos 2 cm del límite superior de la placa, usando la mezcla hexano/éter etílico (50:50, v/v) para separar los lípidos neutros. Terminado el primer desarrollo se marcó con yodo la banda correspondiente al patrón de DAG y se llevó a cabo un segundo desarrollo para separar los lípidos polares. La mezcla usada en este caso fue cloroformo/metanol/ácido acético/agua (80:40:6:2, v/v/v/v). Este desarrollo se llevó a cabo hasta que el frente llegó justo por debajo de la banda correspondiente a los DAG. Posteriormente, para visualizar las bandas, se introdujo la placa unos minutos en una cubeta con atmósfera de yodo. Por último, se rasparon las bandas correspondientes a las muestras y se introdujeron en viales de centelleo para cuantificar la radiactividad de cada una de ellas.

3.2.2.7.3. Cálculo de la actividad enzimática

La actividad enzimática se expresó como la cantidad de producto obtenido por cantidad de enzima ensayada y por tiempo de ensayo, en pmol/ $\mu\text{g}/\text{min}$ o nmol/mg/min.

Para calcular los moles de producto obtenido tras la medida de radiactividad en el contador de centelleo líquido se usó la siguiente fórmula:

$$nmol\ producto = \frac{dpm\ producto - dpm\ control}{2,2 \times 10^3 \times AE}$$

Siendo:

dpm producto = Desintegraciones por minuto del producto.

dpm control = Desintegraciones por minuto del control de la reacción a tiempo cero.

$2,2 \times 10^3$ = Relación entre dpm y nCi (1 nCi = $2,2 \times 10^3$ dpm).

AE = Actividad Específica. Definida como cantidad de radiactividad por unidad de masa (o de volumen) de un compuesto. En este caso, expresada como nCi/nmol.

3.2.2.7.4. Cálculo de la concentración de compuestos radiactivos

Para determinar la concentración de los distintos compuestos radiactivos sintetizados fue necesario cuantificar la radiactividad con un contador de centelleo líquido y aplicar la siguiente fórmula:

$$Molaridad = \frac{dpm}{2,2 \times 10^6 \times AE \times V}$$

Siendo:

dpm producto = Desintegraciones por minuto del producto.

$2,2 \times 10^6$ = Relación entre dpm y nCi (1 μ Ci = $2,2 \times 10^6$ dpm).

AE = Actividad Específica. Definida como cantidad de radiactividad por unidad de masa (o de volumen) de un compuesto. En este caso expresada como μ Ci / μ mol.

V = Volumen usado para medir en el contador de centello líquido en μ l.

3.2.2.8. Análisis de la composición de ácidos grasos de *A. thaliana*

Las semillas a analizar, en un número de 50 aproximadamente se colocaron en tubos de vidrio, se pesaron y se añadieron 60 μ g de ácido heptadecanoico (17:0) como patrón interno y 1 ml de H₂SO₄ 2.5% (v/v) en metanol. Se calentaron a 80 °C y trascurrida 1 h se enfriaron a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron 500 μ l de hexano y 1.5 ml de NaCl 0.9% (p/v) y, tras agitar vigorosamente, se centrifugó a 2000 rpm durante 5 min. Se recogió la fase superior en un vial, se llevó hasta sequedad bajo atmósfera de nitrógeno y se añadieron 100 μ l de hexano. Las muestras se conservaron en el vial cerrado con atmósfera de nitrógeno a -20 °C. Los esteres metílicos obtenidos se analizaron mediante cromatografía de gases.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. CLONACIÓN Y CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE ENZIMAS LISOFOSFATIDILCOLINA ACILTRANSFERASAS DE GIRASOL

4.1.1. CLONACIÓN DE LAS SECUENCIAS COMPLETAS DE LOS GENES *HaLPCAT* EN VECTORES DE CLONACIÓN

El primer paso para buscar genes putativos que codificasen una enzima LPCAT en *Helianthus annuus* fue identificar secuencias proteicas homólogas en *Arabidopsis thaliana*. En la página web ARALIP (Beisson et al., 2013; *The Arabidopsis Acyl-Lipid Metabolism Website*: <http://aralip.plantbiology.msu.edu>) se encontraron dos proteínas de *Arabidopsis* con actividad LPCAT, *AtLPCAT1* (número de acceso de GenBank: NP_172724, codificada por At1g12640) y *AtLPCAT2* (número de acceso de GenBank: NP_176493, codificada por At1g63050) (Theologis et al., 2000). A partir de las secuencias proteicas de estas dos enzimas se buscaron secuencias transcritas (EST, *Expressed Sequence Tag*, marcador de secuencia expresada) de *Helianthus annuus*. Esta búsqueda se realizó en la base de datos del NCBI usando el algoritmo *tblastn*. Dado el alto grado de identidad entre ambas secuencias, los resultados obtenidos con una u otra secuencia fueron los mismos. El alineamiento de estos EST, llevado a cabo con el programa *ClustalX v2.0.10* (Larkin et al., 2007), dio como resultado la identificación de dos isoformas que codificaban LPCAT de girasol, *HaLPCAT1* y *HaLPCAT2*.

Mediante el uso del algoritmo *blastx* se agruparon, para cada isoforma, los distintos conjuntos de secuencias homólogas que codificaban la misma zona de la proteína. El solapamiento existente entre algunos EST permitió realizar un ensamblaje *in silico* de la secuencia nucleotídica completa de ambas isoformas.

Se confirmó que se tenían las secuencias completas de las regiones codificantes traduciéndolas a aminoácidos y comparándolas con secuencias conocidas de otras LPCAT de plantas. Para ello, se realizó, a partir secuencias aminoacídicas de cada isoforma, una búsqueda de secuencias proteicas homólogas depositadas en la base de datos del NCBI usando el algoritmo *blastp*.

A partir de las secuencias de *HaLPCAT1* y *HaLPCAT2* se buscaron secuencias de *Helianthus annuus* depositadas en la base de datos del genoma de girasol (<https://www.sunflowergenome.org>), obteniéndose la secuencia completa de la región codificante de la tercera isoforma, *HaLPCAT3*.

Una vez identificadas las regiones codificantes de las tres isoformas, se diseñaron pares de oligonucleótidos específicos para la amplificación de cada una a partir de las secuencias de sus extremos. A estos oligonucleótidos se les añadieron dianas de restricción en sus extremos para facilitar la posterior clonación en el vector de expresión. Los oligonucleótidos diseñados, cuyas secuencias se encuentran detalladas en el Anexo 1, fueron: *BamHIIHaLPCAT1F* y *XhoIHaLPCAT1R*, *BamHIIHaLPCAT2F* y *XhoIHaLPCAT2R* y *EcoRIHaLPCAT3F* y *XhoIHaLPCAT3R*.

Haciendo uso de estos oligonucleótidos se procedió a amplificar las regiones codificantes de los genes mediante PCR de alta especificidad y fidelidad. Como molde de la reacción se tomó ADNc comprendido entre los 15 DDF y los 35 DDF porque es en este periodo cuando el contenido en aceite de la semilla de girasol incrementa (Martínez-Force et al., 1998; Robertson et al., 1978; Aznar-Moreno et al., 2013) y, por tanto, se espera que la ruta de síntesis de TAG sea más activa y que se expresen a altos niveles los genes implicados en ella. En concreto se usó ADNc obtenido de semillas de girasol de la línea silvestre CAS-6 de 25 DDF.

Los productos amplificados mediante PCR fueron aislados y purificados mediante electroforesis, observándose, en cada caso, una única banda del tamaño esperado. Los

fragmentos de ADN observados fueron de 1389, 1380 y 1392 pb para *HaLPCAT1*, *HaLPCAT2* y *HaLPCAT3*, respectivamente. Los productos de PCR purificados de *HaLPCAT1* y *HaLPCAT2* se adenilaron y se ligaron en pMBL-T y el producto de PCR purificado de *HaLPCAT3* se ligó directamente en pJET1.2. Con los productos de estas ligaciones se transformó *E. coli* y mediante PCR de colonias se comprobó que los transformantes poseían las construcciones de interés. Los oligonucleótidos usados en la PCR de colonias fueron M13F y M13R para *HaLPCAT1* y *HaLPCAT2* y pJET1.2F y pJET1.2R para *HaLPCAT3* (Anexo 1). A continuación, se extrajo el ADN plasmídico de aquellos transformantes que poseían las construcciones de interés, es decir, pMBL-T::*HaLPCAT1*, pMBL-T::*HaLPCAT2* y pJET1.2::*HaLPCAT3*. Por último, se comprobó que las construcciones poseían el inserto mediante digestión con las enzimas *Bam*HI y *Xho*I para *HaLPCAT1* y *HaLPCAT2* y con las enzimas *Eco*RI y *Xho*I para *HaLPCAT3* y las que lo poseían se enviaron a secuenciar.

Se confirmaron las identidades de las secuencias clonadas por homología con secuencias de otras LPCAT de plantas depositadas en la base de datos del NCBI. Para ello, las secuencias nucleotídicas obtenidas se tradujeron a aminoácidos y con cada una de las secuencias aminoacídicas se realizó una búsqueda de secuencias homólogas con el algoritmo *blastp*. Las secuencias, tanto nucleotídicas como aminoacídicas de *HaLPCAT1*, *HaLPCAT2* y *HaLPCAT3* fueron depositadas en la base de datos GenBank con los números de acceso JN112899 y AER57988 (*HaLPCAT1*), JN112900 y AER57989 (*HaLPCAT2*) y KY235263 y AERQ87991 (*HaLPCAT3*), respectivamente y se muestran en el Anexo 3. Estos 3 genes correspondieron a los únicos genes LPCAT encontrados dentro del genoma del girasol según la base de datos de <https://www.sunflowergenome.org>, donde están codificados como HanXRQChr13g0416721 (*HaLPCAT1*), HanXRQChr02g0048801 (*HaLPCAT2*) y HanXRQChr17g0533761 (*HaLPCAT3*) y que se encuentran presentes en los cromosomas 13, 2 y 17.

Las estructuras de los genes LPCAT de girasol fueron similares a las presentadas por los genes de *Arabidopsis*, con 8 exones separados por 7 intrones (Figura 22). En el caso de *Arabidopsis* la similitud estructural de los genes LPCAT apunta a una duplicación del gen dentro de la especie/género, como ya se ha observado para otros genes de esta planta a pesar de su reducido tamaño del genoma. Por otra parte, el girasol es una especie de origen híbrido reconocido, cuyo genoma consiste en 17 pares de cromosomas, producto de hibridación entre dos especies ancestrales de 9+8 y posterior estabilización por diploidía. De esta forma, cabría esperar la presencia de dos genes de cada una de las especies, lo cual implicaría la presencia de cuatro genes, sin embargo, encontramos uno de características genómicas muy similares a los de *Arabidopsis* y otros dos con estructura diferente ya que presentaron intrones mucho más largos. Esto apuntaría a la pérdida de un gen durante el proceso de estabilización del híbrido y a la variación de los otros dos por degeneración de intrones en una especie como el girasol que presenta gran número de elementos transponibles.

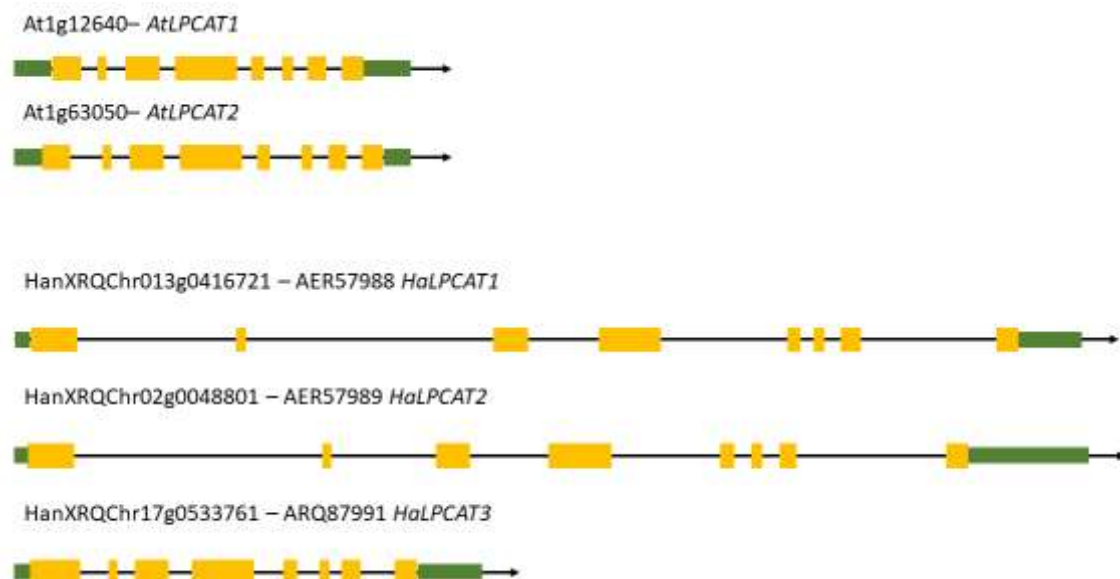


Figura 22. Esquema de las estructuras génicas de los genes codificantes de las enzimas LPCAT de *Arabidopsis thaliana* (*AtLPCAT1* y *AtLPCAT2*) y de girasol (*HaLPCAT1*, *HaLPCAT2* y *HaLPCAT3*).

4.1.2. CARACTERÍSTICAS DE LAS SECUENCIAS AMINOACÍDICAS DE LAS PROTEÍNAS *HaLPCAT*

Las tres isoformas *HaLPCAT* clonadas codifican aciltransferasas con una diferencia de tamaño de tan sólo 4 aminoácidos, siendo la de menor tamaño *HaLPCAT2* con 459 aminoácidos, seguida de *HaLPCAT1* con 462 aminoácidos y de *HaLPCAT3* con 463 aminoácidos.

Los pesos moleculares y los puntos isoelectricos estimados, así como los porcentajes de residuos aminoácidos ácidos y básicos e hidrofóbicos e hidrofílicos de las tres isoformas fueron bastante similares (Tabla 5).

Tabla 5. Características de las proteínas *HaLPCAT*.

	<i>HaLPCAT1</i>	<i>HaLPCAT2</i>	<i>HaLPCAT3</i>
Tamaño (aminoácidos)	462	459	463
Peso molecular (kDa)	51.88	51.56	52.37
Punto isoelectrico	9.36	9.40	9.51
Residuos ácidos (%)	5.80	5.70	5.60
Residuos básicos (%)	11.9	11.3	12.5
Residuos hidrofóbicos (%)	48.9	49.0	47.3
Residuos hidrofílicos (%)	33.3	34.0	34.6

Al comparar entre sí las secuencias aminoacídicas de *HaLPCAT1*, *HaLPCAT2* y *HaLPCAT3* se observó un elevado porcentaje de similitud en las secuencias. Las isoformas que presentaron mayor identidad entre ellas fueron *HaLPCAT1* y *HaLPCAT2*, con un 83%, mientras que *HaLPCAT1* y *HaLPCAT2* mostraron un porcentaje de dicho parámetro del 73% respecto a *HaLPCAT3*.

Tras realizar una búsqueda con las secuencias de las tres proteínas en la base de datos de dominios conservados (*Conserved Domain Database*, CDD; Marchler-Bauer y Bryant, 2004; Marchler-Bauer et al., 2011, 2015 y 2017), el programa BLAST 2.0 del servidor del NCBI las incluyó dentro de la familia de proteínas MBOAT.

Las secuencias aminoacídicas de varias LPCAT pertenecientes a esta familia se alinearon con las formas de girasol (Figura 23) observándose un alto nivel de homología entre todas las formas, con pocos espacios en el alineamiento, a pesar de que se abarcó un amplio rango taxonómico de especies (plantas dicotiledóneas, una monocotiledónea y una de musgo). Esto indica que se ha mantenido con un elevado grado de conservación a lo largo del periodo que abarca la evolución de estas especies.

Este alineamiento de secuencias permitió localizar los dos residuos polares que están altamente conservados en las proteínas de la familia MBOAT; una histidina, probablemente implicada en la catálisis, que se encuentra dentro de una larga región de residuos hidrófobos y una asparagina, probablemente implicada en la unión al sustrato acil-CoA, que se localiza dentro de una región hidrofílica (Hofmann, 2000; Chang et al., 2011; Arroyo-Caro et al., 2013). Estos residuos catalíticos fueron la His³⁵⁶ y la Asn³¹⁸ en las tres enzimas *HaLPCAT* (Figura 23).

Además, también se pudieron identificar los cuatro motivos (A-D) descritos para las enzimas lisofosfolípido aciltransferasas (LPLAT) pertenecientes a la familia MBOAT; motivo A (WD), motivo B (WHGxxxGYxxxF), motivo C (YxxxxF) y motivo D (YxxxYFxxH) (Shindou et al., 2009). Las aciltransferasas de la familia MBOAT que acilan aminoácidos solo presentan el motivo B, lo que parece indicar que son los motivos A, C y/o D de las enzimas LPLAT, los que podrían estar implicados en la unión al sustrato lisofosfolípido (Shindou et al., 2009).

A excepción de un cambio del ácido aspártico (D) del motivo A por una arginina (R) en la secuencia de *HaLPCAT3* (Arg²⁹⁴) o por una treonina (T) en la secuencia de *PpLPCAT* (Thr²⁹⁸), los motivos (A-C) se conservan tal y como se describieron. Sin embargo, coincidiendo con lo observado en las secuencias de otras proteínas LPCAT de plantas clonadas y caracterizadas (Arroyo-Caro et al., 2013; Zheng et al., 2012; Zhang et al., 2015; Ståhl et al., 2008), el motivo D (YxxxYFxxH) no estuvo presente en dicha forma en todas las LPCAT examinadas. En base a los alineamientos publicados por estos autores y a las secuencias aminoacídicas deducidas de las tres isoformas clonadas en este trabajo, parece que en las proteínas LPCAT de plantas este motivo se conserva como YxSVxxxGT; excepto en la proteína *AtLPCAT2* en cuya secuencia el residuo tirosina (Y) está remplazado por una fenilalanina (F), el residuo Phe⁴³¹. La fenilalanina tiene una estructura similar a la tirosina, presentando, al igual que esta, un anillo aromático, por lo que se esperaría que ambos residuos tuvieran un comportamiento similar.

Las posiciones en las que se encuentran estos cuatro motivos en las secuencias de las tres proteínas LPCAT de girasol son: ²⁹³WD²⁹⁴, ³⁵⁵WHGxxxGYxxxF³⁶⁵, ⁴¹¹YxxxxF⁴¹⁶ y ⁴²⁸YxSVxxxGT⁴³⁶ en *HaLPCAT1*; ²⁹³WD²⁹⁴, ³⁵⁵WHGxxxGYxxxF³⁶⁵, ⁴⁰⁸YxxxxF⁴¹³ y ⁴²⁵YxSVxxxGT⁴³³ en *HaLPCAT2*; y ²⁹³WR²⁹⁴, ³⁵⁵WHGxxxGYxxxF³⁶⁵, ⁴¹¹YxxxxF⁴¹⁶ y ⁴²⁸YxSVxxxGT⁴³⁶ en *HaLPCAT3*.

Además de estos residuos, Zhang et al., 2015 señalan la existencia de otros dos residuos conservados que podrían ser críticos para la actividad lisofosfolípido aciltransferasa, un residuo serina (S) que ocupa la posición 130 en las secuencias *HaLPCAT* y un residuo leucina (L) que ocupa la posición 325 en dichas secuencias.

Se han encontrado dos familias génicas distintas que codifican proteínas con actividad LPCAT, AGPAT y MBOAT (Shindou et al., 2009). En las secuencias de las proteínas *HaLPCAT* no se encontraron los dominios característicos de la familia AGPAT, HX₄D y EGT (Shindou et al., 2009; Lewin et al., 1999; Coleman y Lee, 2004; Heath y Rock, 1998; Harayama et al., 2008; Nakanishi et al., 2006; Chen et al., 2006; Shindou et al., 2007), a excepción de *HaLPCAT1* que contiene el dominio HX₄D. A pesar de esto, esta proteína no se clasificó en la familia AGPAT,

ya que no contenía la secuencia EGT y además, como se indicó anteriormente, contiene los cuatro dominios característicos de la familia MBOAT.

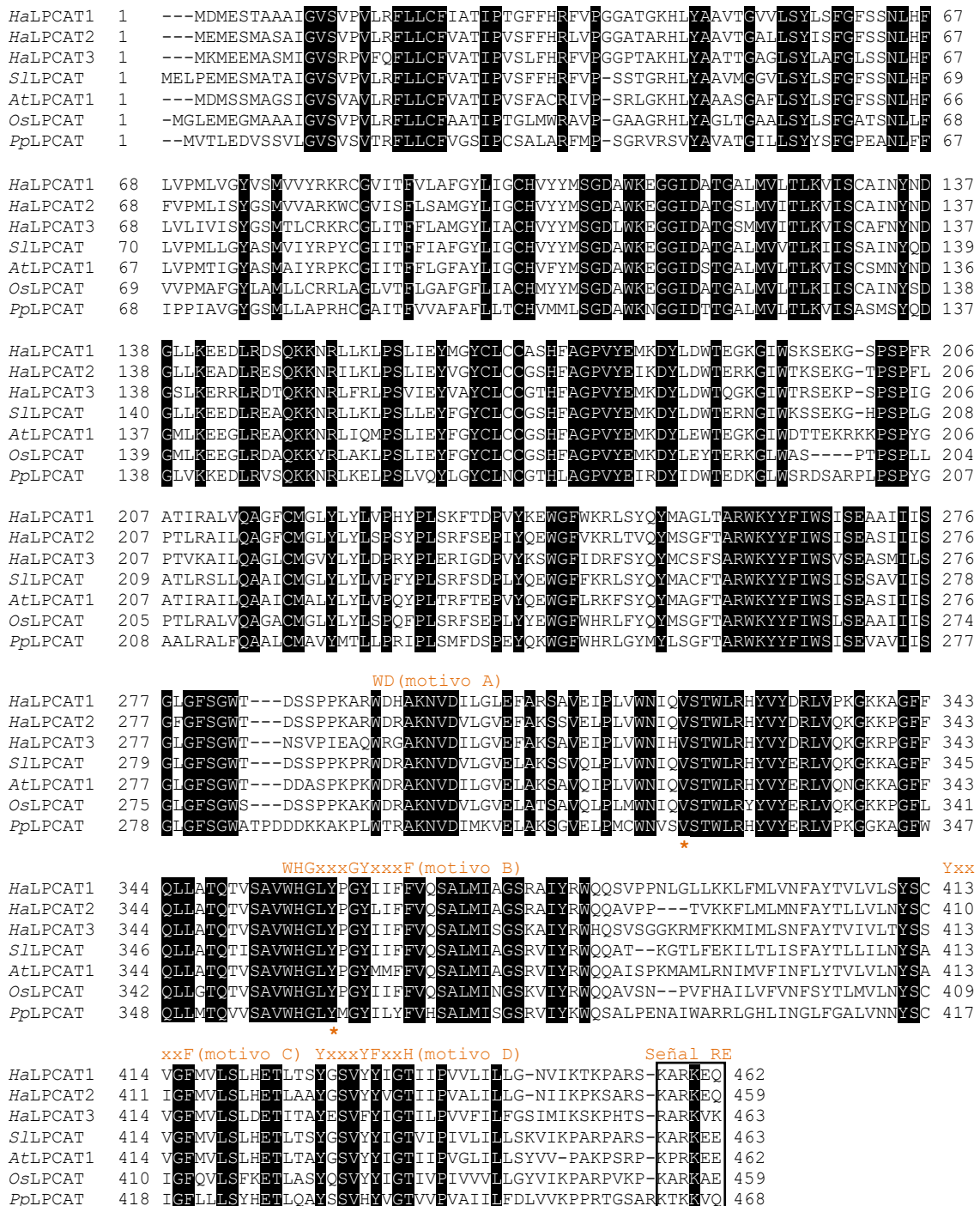


Figura 223. Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de las proteínas HaLPCAT con proteínas homólogas de varias especies de Viridiplantae. Las plantas a las que pertenecen las secuencias y los números de acceso de GenBank son: SILPCAT (*Solanum lycopersicum*, XP_004244602), AtLPCAT1 (*Arabidopsis thaliana*, NP_172724), OsLPCAT (*Oryza sativa*, XP_015626464) y PpLPCAT (*Physcomitrella patens*, XP_001780460). Los dos residuos altamente conservados en las proteínas de la familia MBOAT están señalados con una estrella, las secuencias de los cuatro motivos (A-D) descritos para las enzimas LPLAT pertenecientes a

la familia MBOAT están detalladas en naranja y las señales de retención al retículo endoplásmico (Señal RE) se encuentran marcadas con un cuadrado. Con fondo negro aparecen los aminoácidos que son idénticos en todas las secuencias.

En los extremos C-terminales de las secuencias de *HaLPCAT1*, *HaLPCAT2* y *HaLPCAT3* aparece un motivo de dilisina correspondiente con una señal de retención en el retículo endoplásmico (Figura 23). Si bien la posición de las dos lisinas no coincide con la posición que tienen en el motivo clásico de retención propio de esta localización, KKXX, definido para plantas, mamíferos y levaduras por Benghezal et al. (2000), un estudio posterior indicó que este motivo posee una diversidad mucho mayor que la propuesta originalmente, pudiéndose encontrar distintas combinaciones de dilisina (Gidda et al., 2009).

La presencia de este motivo de retención al retículo endoplásmico está en concordancia con los resultados que ofrece el programa de predicción de localización subcelular *DeepLoc* (Almagro-Armenteros et al., 2017), que utiliza un algoritmo de redes neuronales y se basa en secuencias de proteínas cuyas localizaciones han sido demostradas experimentalmente (Figura 24). Estas predicciones sugieren que las tres proteínas LPCAT ejercen su función en este compartimento celular, aunque este resultado debe ser respaldado por estudios experimentales de localización.

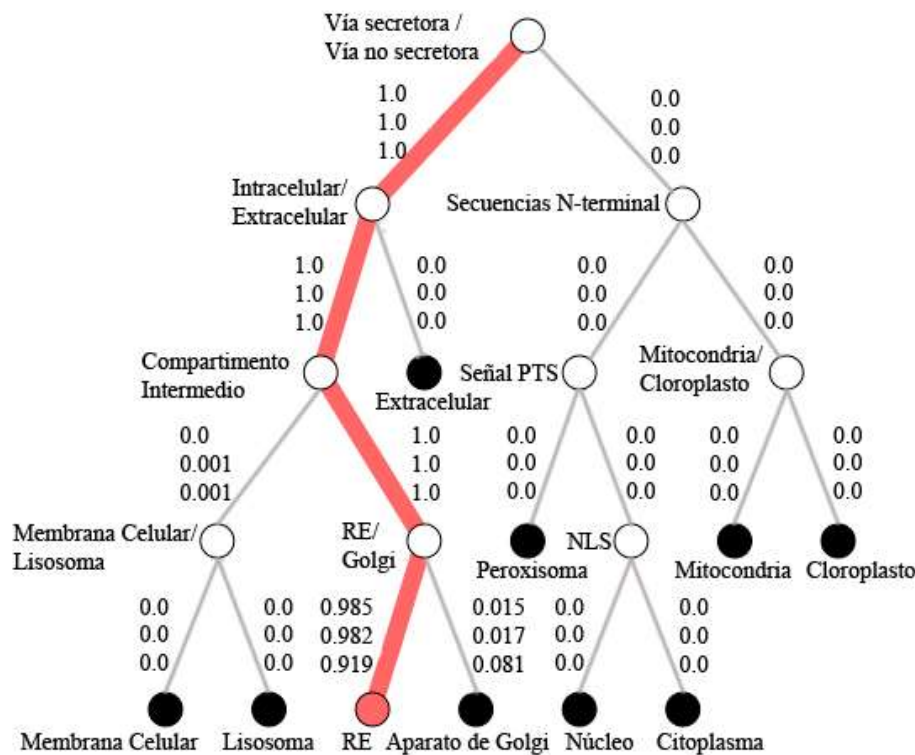
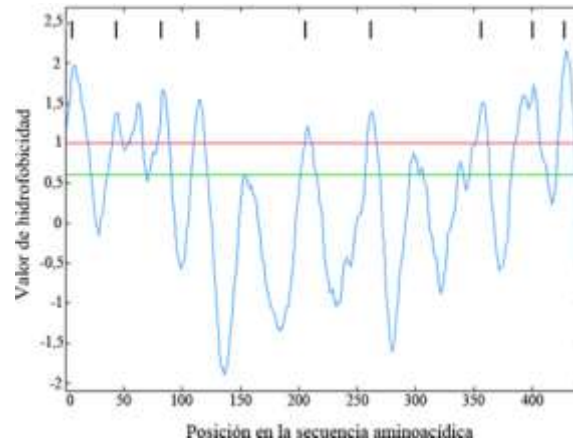


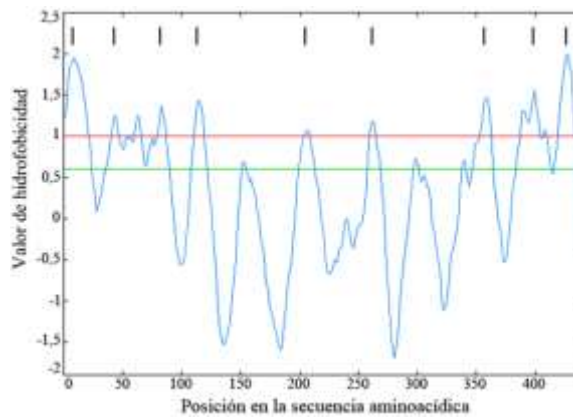
Figura 24. Algoritmo de predicción de la localización subcelular de las proteínas *HaLPCAT*. Los valores numéricos indican la probabilidad de localización de las proteínas en el medio extracelular, en la membrana celular, en el citoplasma o en distintos orgánulos celulares. De los tres números que aparecen en cada sección el primero pertenece a *HaLPCAT1*, el segundo a *HaLPCAT2* y el tercero a *HaLPCAT3*. En rojo se indica la localización subcelular más probable. Los resultados se obtuvieron con el programa *DeepLoc* (Almagro-Armenteros et al., 2017). RE: retículo endoplásmico, NLS: señal de localización nuclear, PTS: secuencia de señal al peroxisoma.

Como parte del análisis de las secuencias aminoacídicas de estas enzimas, se realizaron predicciones de dominios de transmembrana mediante el programa *TopPred II* (von Heijne, 1992; Claros y von Heijne, 1994) usando la escala de hidrofobicidad KD (Kyte y Doolittle, 1982). De esta manera se pudo constatar la presencia de nueve dominios de transmembrana para las tres proteínas *HaLPCAT* (Figuras 25 y 26).

A



B



C

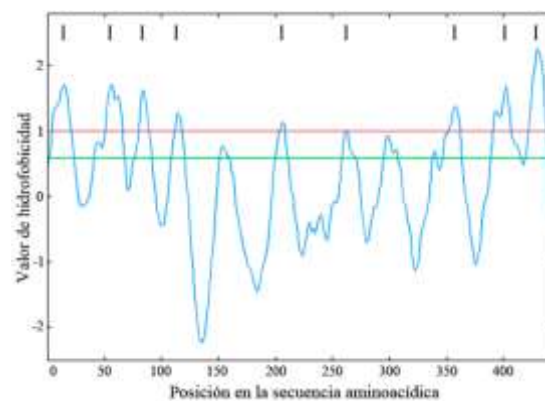


Figura 23. Perfil de hidrofobicidad de *HaLPCAT1* (A), *HaLPCAT2* (B) y *HaLPCAT3* (C). Los perfiles se determinaron con el programa *TopPred II* (von Heijne, 1992; Claros y von Heijne, 1994). Las regiones con valores superiores a 1 son dominios de transmembrana "probables" y las regiones con valores superiores a 0.6 son dominios de transmembrana "posibles". Las barras verticales sobre los perfiles indican las posiciones de los dominios de transmembrana "probables".

HaLPCAT1	1	MDMEST	AAAI	IGVSVPLRFLLCFIAT	PTGFFHRFVPGGATGK	HL	YAAVTGWVLSYLSFG
HaLPCAT2	1	MEMEMAS	A	IGVSVPLRFLLCFVATIPV	SFFHRLVPGGATAR	HL	YAAVTGALLSYISFG
HaLPCAT3	1	MKMEEMAS	IGVSR	VPVQFLLCFVATIPVSLFHR	FVPGGPTAKHL	YA	ATTGAGLSYLAFG
HaLPCAT1	61	FSSN	LHFLVPM	LVGYVSMVYV	KRC	GVITFVLA	FGYLGCHVY
HaLPCAT2	61	FSSN	LHFFVPM	ISYGSMVVAR	KW	CGVISF	LSAMGYLGCHVY
HaLPCAT3	61	LSSN	LHFLVLIVISY	GSMTLCRK	RC	GLITF	FLAMGYLIACHVY
HaLPCAT1	121	LM	VTLKVISCAIN	YNDGLLKEEDLRDSQ	KNRLLK	LPSLIE	YMGYCLCCASHFAGPVYE
HaLPCAT2	121	LM	VITLKVISCAN	YNDGLLKEADLRESQ	KNRILK	LPSLIE	YVGYCLCCGSHFAGPVYE
HaLPCAT3	121	MM	VITLKVISCAN	YNDGSLKERRLRDTQ	KNR	LFR	LPSLVIEYVAYCLCCGTHFAGPVYE
HaLPCAT1	181	MKDYLDWTEG	KGIWSKSEK	GSPSPFR	AT	IRALVOAGFCMGLYL	LYLVP
HaLPCAT2	181	IKDYLDWTER	KGIWTKSEK	GTPSPFL	PT	LRAILOAGFCMGLYL	LYLS
HaLPCAT3	181	MKDYLDWTQ	GKIWTRSEK	PSPSPIC	PT	VKAILOAGLCMGVYL	LYLDF
HaLPCAT1	241	EWGFVKRLS	YQYMAGLTAR	WKY	YF	IWSISEAAI	IISGLGFSGW
HaLPCAT2	241	EWGFVKRLT	VQYMSGFTAR	WKY	YF	IWSISEASI	IISGFGFSGW
HaLPCAT3	241	SWGFI	DRFSYQYMC	SFSARWKY	YF	IWSVSEASMIL	SGLGFSGW
HaLPCAT1	301	ILGLEFARS	AVEIPLVW	NIQVSTWLR	HYVYDRL	VPKG	KAGFFQLLATQTVSAVW
HaLPCAT2	301	VLGVEFAK	SVELPLVW	NIQVSTWLR	HYVYDRL	VQK	GKPGFFQLLATQTVSAVW
HaLPCAT3	301	ILGVEFAK	SAVEIPLVW	NIHVSTWLR	HYVYDRL	VQK	GKRPGFQLLATQTVSAVW
HaLPCAT1	361	GYI	IFFVOSALMIAGSRA	IYRWQQSVP	PNL	GLL	KKLFMLVN
HaLPCAT2	361	GYL	IFFVOSALMIAGSRA	IYRWQQA	VPP	--	TVKKFLMLMN
HaLPCAT3	361	GYI	IFFVOSALMISGSKA	IYRWHQSVS	GGK	RMFKKM	IMLSN
HaLPCAT1	421	LH	ETLTSY	GSVYYIGTIIP	WVLLILG	NVI	KTKPARSKARKEQ
HaLPCAT2	418	LH	ETLAAYG	SVYYVGTIIP	VALILG	NIIK	PKSARSKARKEQ
HaLPCAT3	421	LD	ETITAYE	SVFYIGTIL	PVWFIL	FGS	IMIKSKPHTSRARKVK

Figura 24. Dominios de transmembrana de las enzimas *HaLPCAT*. En las secuencias aminoacídicas de las proteínas *HaLPCAT* se encuentran enmarcados en verde los 9 dominios de transmembrana predichos con el programa *TopPred II* (von Heijne, 1992; Claros y von Heijne, 1994) y marcados en rojo se muestran los dos aminoácidos altamente conservados en las proteínas de la familia MBOAT.

Este modelo estructural con varios dominios de transmembrana es similar al encontrado en otras proteínas LPCAT como la de *Ricinus communis* (Arroyo-Caro et al., 2013) o *Nicotiana benthamiana* (Zhang et al., 2015) y es una propiedad característica compartida por las proteínas de la familia MBOAT (Chang et al., 2011; Hofmann, 2000).

El hecho de que los dominios de transmembrana se distribuyan a lo largo de toda la extensión de la cadena polipeptídica, sugiere que estas enzimas son proteínas integrales de membrana y, de acuerdo con las predicciones de localización subcelular, se encontrarían en la membrana del retículo endoplásmico. Estos resultados, junto con los dominios identificados de actividad aciltransferasa, están en consonancia con la hipótesis de que las enzimas LPCAT participan en la síntesis de lípidos de membrana en el retículo endoplásmico.

4.1.3. MECANISMO ENZIMÁTICO PROPUESTO PARA LAS ENZIMAS *HaLPCAT*

El mecanismo enzimático de las proteínas aciltransferasas pertenecientes a la familia MBOAT es desconocido debido a la falta de información sobre sus estructuras tridimensionales.

El modo de acción de las enzimas LPCAT podría ser similar al postulado para otras aciltransferasas, de forma que un residuo histidina actuaría como base tomando un protón del grupo hidroxilo de la posición *sn-2* del aceptor de acilo (LPC), aumentando así la reactividad del mismo y su nucleofilicidad sobre el tioéster del donador de acilos (acil-CoA), y un residuo de ácido aspártico podría encontrarse próximo a la histidina promoviendo con la misma un

intercambio de protones que le permitiría actuar como un nucleófilo más fuerte (Frentzen y Wolter, 1998; Heath y Rock, 1998; Coleman y Lee, 2004) (Figura 27).

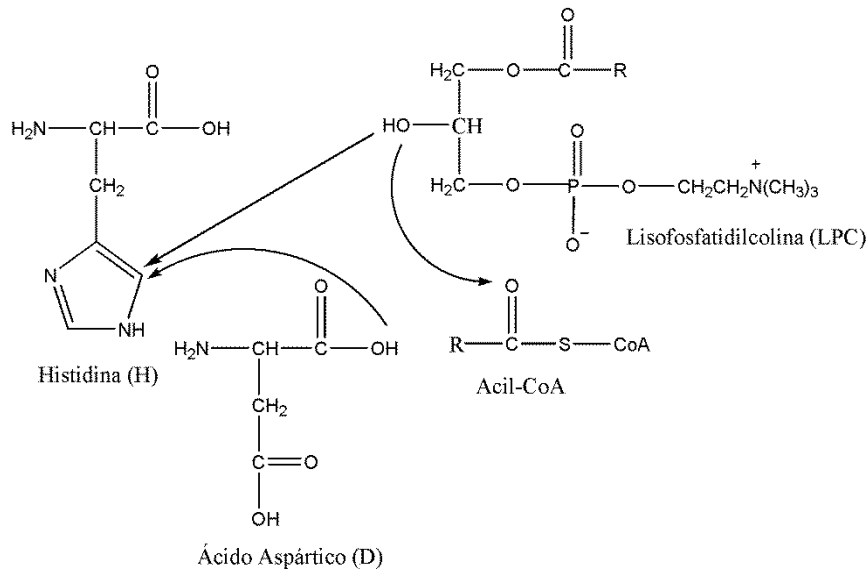


Figura 25. Mecanismo de acción propuesto para las enzimas LPCAT. Modificado de Frentzen y Wolter, 1998.

Si este fuera el modo de acción, se podría pensar que la histidina que actuaría como base sería la perteneciente al motivo B, que es un residuo altamente conservado en las proteínas de la familia MBOAT y que se cree que está implicado en la catálisis.

4.1.4. ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE LAS PROTEÍNAS *HaLPCAT*

Se analizaron las relaciones evolutivas de las proteínas LPCAT generando un árbol filogenético a partir de las secuencias aminoacídicas de las proteínas *HaLPCAT* y de las proteínas homólogas de otras plantas, utilizando las algas verdes (*Chlorophyta*) como grupo externo para enraizar el árbol.

Como muestra el árbol filogenético (Figura 28), las proteínas LPCAT se distribuyen ampliamente en el reino vegetal, lo que es coherente con el hecho de que estas proteínas desempeñan un papel importante en el metabolismo de los fosfolípidos.

El árbol filogenético reveló que todas las proteínas LPCAT de las plantas dicotiledóneas analizadas, y entre ellas las proteínas *HaLPCAT*, forman un clado grande, lo que sugiere que en esta clase de plantas estas proteínas tienen un origen filogenético común. Además, la distribución de las especies fue consistente con los árboles convencionales de especies, donde las especies de dicotiledóneas y monocotiledóneas se diferencian de *Chlorophyta* (algas verdes) y *Bryophyta* (musgos).

A partir del árbol filogenético, se puede deducir que las proteínas *HaLPCAT* están estrechamente relacionadas con las isoformas del tomate (*Solanum lycopersicum*), que al igual que el girasol pertenece a la subclase *Asteridae*. El porcentaje de identidad que presentan estas proteínas es bastante elevado. Así, *HaLPCAT1* presenta porcentajes de identidad con las isoformas del tomate del 74-81%, *HaLPCAT2* del 73-80% y *HaLPCAT3* del 65-68%. Por su

parte las isoformas del girasol solo comparten un 34-38% de identidad con las proteínas homólogas de algas verdes que fueron usadas para enraizar el árbol.

Como puede observarse en el árbol filogenético, la existencia de más de una isoforma LPCAT en el mismo organismo no es exclusiva de *Helianthus annuus*. Así, se identificaron dos isoformas LPCAT en muchas de las especies de plantas estudiadas como *Populus trichocarpa* o *Glycine max* y en todos los miembros analizados de la familia *Brassicaceae*, lo cual está reflejando probablemente duplicaciones génicas recientes. Sin embargo, en otras plantas cuyos genomas están completamente secuenciados, como la vid (*vitis vinifera*) o el arroz (*Oryza sativa*), solo se identificó una isoforma. En el tomate (*Solanum lycopersicum*), al igual que en el girasol, se han encontrado tres isoformas.

A pesar del largo período de tiempo transcurrido desde la divergencia de algas verdes y plantas superiores, parece que las proteínas LPCAT han sido altamente conservadas a lo largo de la evolución y han sufrido poca diversificación funcional, lo que apunta a un papel importante dentro del metabolismo lipídico a la hora de conferir a las plantas capacidad de adaptación al medio.

4.1.5. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE LOS GENES *HaLPCAT* EN SEMILLAS Y TEJIDOS VEGETATIVOS

Para determinar los patrones de expresión de los genes *HaLPCAT* clonados se realizó un estudio mediante PCR cuantitativa con muestras de ADNc de raíz, tallo, hoja, cotiledón y semillas de 12 a 28 DDF de la línea control de girasol CAS-6.

Los oligonucleótidos usados para realizar estas PCR se diseñaron de forma que amplificasen una región de entre 100 y 300 pb con el fin de obtener una mayor eficiencia en la amplificación. Los pares de oligonucleótidos diseñados fueron q*HaLPCAT1*F/q*HaLPCAT1*R que amplificaba

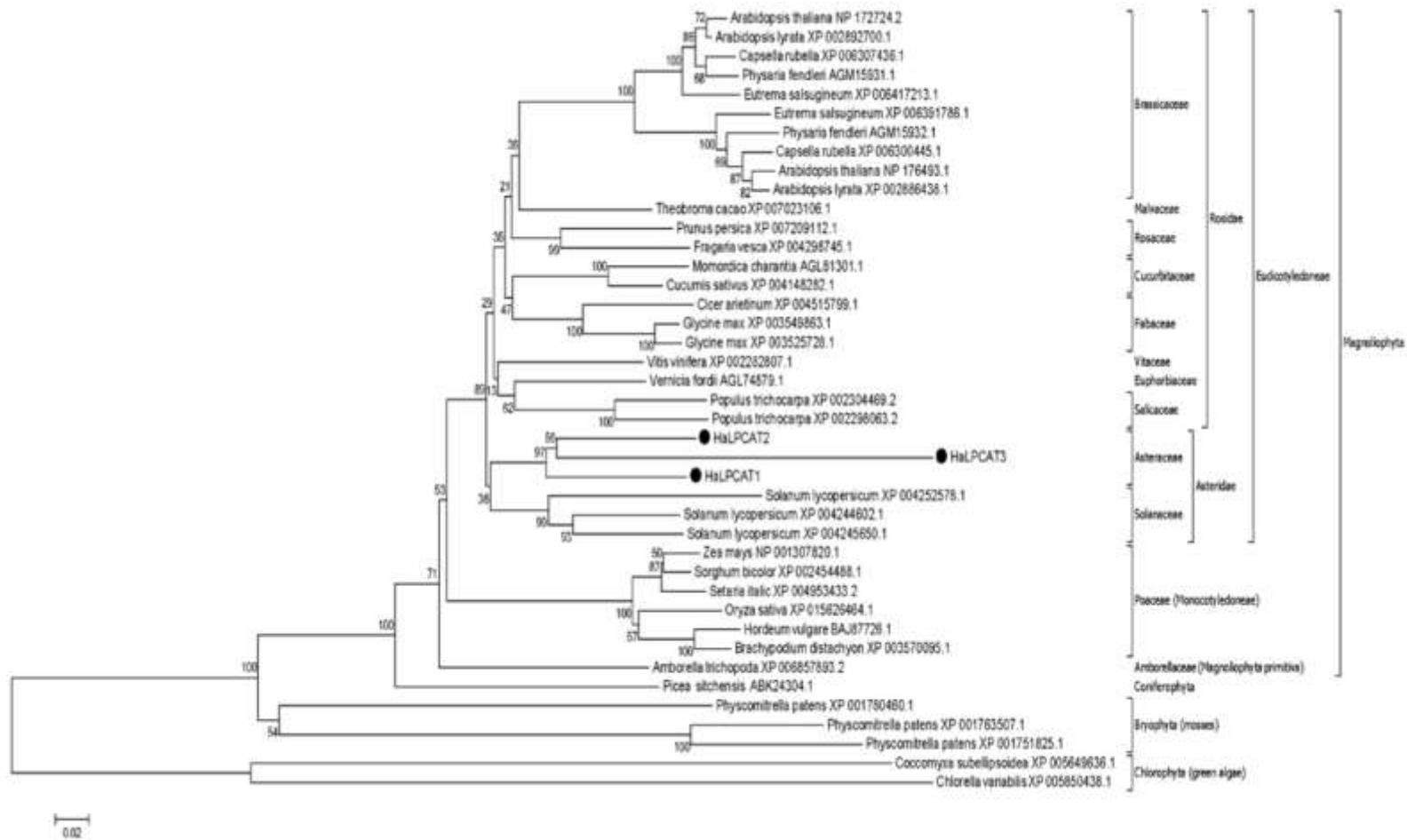


Figura 28. Árbol filogenético de las proteínas *HaLPCAT* junto con proteínas homólogas de distintas especies vegetales. El árbol se realizó con el programa MEGA6 (Tamura et al., 2013) aplicando el método *Neighbor-Joining* y utilizando las algas verdes (*Chlorophyta*) como grupo externo para enraizar el árbol.

un fragmento de 214 pb de *HaLPCAT1*, *qHaLPCAT2F/qHaLPCAT2R* que amplificaba 136 pb de *HaLPCAT2*, *qHaLPCAT3F/qHaLPCAT3R* que amplificaba 114 pb de *HaLPCAT3* y el par *qHaACTF/qHaACTR* que amplificaba 96 pb del gen actina de girasol (*HaACT1*, FJ487620), que se usó como gen calibrador. Sus secuencias se detallan en el Anexo 1. Estos oligonucleótidos se diseñaron de forma que fuesen específicos para cada isoforma. Este proceso implicó la comprobación de la especificidad de los mismos realizando a partir de ellos una búsqueda con el algoritmo *blastn* en la base de datos de EST de *Helianthus annuus* del NCBI. Posteriormente, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2% (p/v) de los productos obtenidos tras realizar una PCR preliminar con ellos, lo que permitió confirmar las especificidades de los mismos al observarse un único producto de la longitud esperada. Para determinar la eficiencia de amplificación de cada pareja de oligonucleótidos se realizó una recta de calibrado. En todos los casos, la eficiencia de amplificación (obtenida mediante la ecuación mostrada en el apartado 3.2.1.4.6.) estaba comprendida entre un 90 y un 110% y el coeficiente de regresión fue ≥ 0.985 , indicando que las condiciones de ensayo eran adecuadas en cuanto a reproducibilidad y sensibilidad.

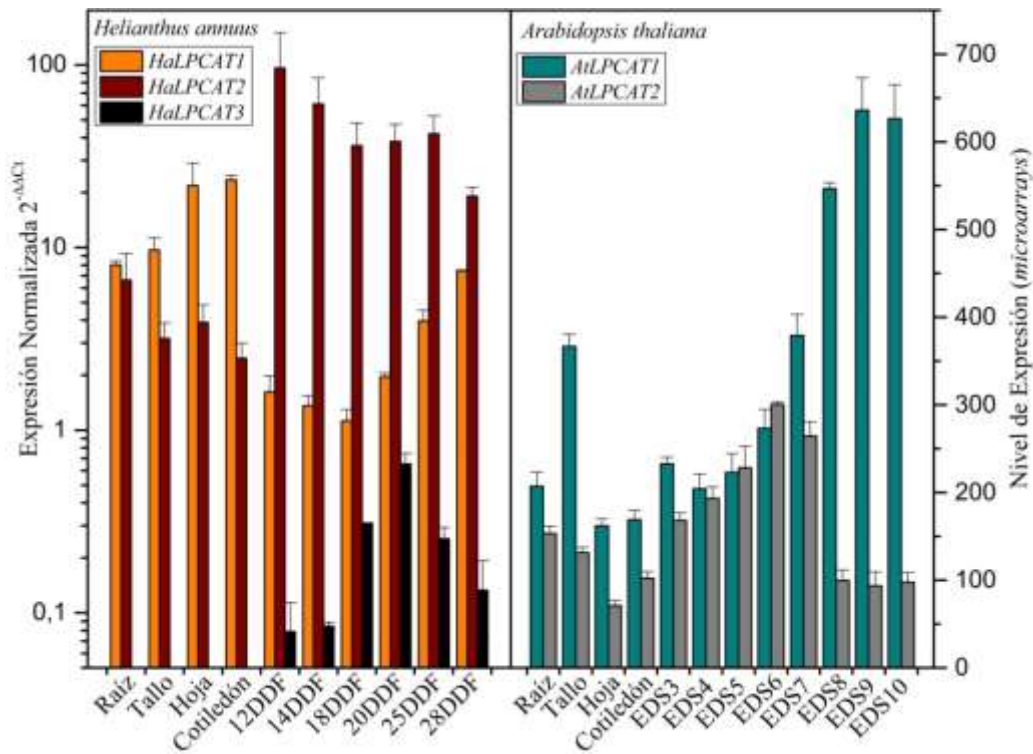


Figura 26. Perfil de expresión de genes *LPCAT* de *Helianthus annuus* (A) y de *Arabidopsis thaliana* (B) en tejidos vegetativos y en semillas en desarrollo. Los datos de expresión de *HaLPCAT1*, *HaLPCAT2* y *HaLPCAT3* se obtuvieron mediante PCR cuantitativa, usando ADNc de girasol de la línea silvestre CAS-6 y el gen de la actina de girasol (*HaACT1*, FJ487620) como gen calibrador. Los datos representan los valores medios \pm desviación estándar de tres muestras biológicas independientes y dos replicados técnicos por cada replicado biológico. Los datos de expresión de *AtLPCAT1* (*NP_172724*, *At1g12640*) y *AtLPCAT2* (*NP_176493*, *At1g63050*) se obtuvieron de la base de datos de expresión génica en *Arabidopsis thaliana* de la Universidad de Toronto (Schmid et al., 2005; <http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>). DDF: Días Después de Floración; EDS Estadio De la Semilla: 3: embriones en fase globular; 4: embriones en fase de temprano a fase tardía de corazón; 5: embriones en fase de corazón tardía a mediados de torpedo; 6: embriones de mediados a tarde fase de torpedo; 7: embriones de fase tardía de torpedo a temprana de bastón; 8: embriones en fase de bastón a cotiledón; 9: embriones de fase de cotiledón a semilla madura; 10: semilla madura.

En las curvas de desnaturalización obtenidas tras realizar las PCR cuantitativas (datos nos mostrados) se observó un único pico aislado, que permitió confirmar la ausencia de dímeros de oligonucleótidos y la especificidad de productos de PCR, ya que cada producto posee un pico de desnaturalización característico en función de su composición nucleotídica.

En la Figura 29 se comparan los perfiles de expresión obtenidos para las tres isoformas *LPCAT* de girasol con los perfiles de expresión de las dos isoformas *LPCAT* de *Arabidopsis thaliana*, que están publicados en la base de datos de expresión génica en *Arabidopsis thaliana* de la Universidad de Toronto (Schmid et al., 2005; <http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>). Como puede observarse en dicha figura, *HaLPCAT1* y *HaLPCAT2*, al igual que ocurre con *AtLPCAT1* y *AtLPCAT2*, se expresan en todos los tejidos ensayados, lo cual indica que estas enzimas tienen un papel importante en el metabolismo general de lípidos, participando tanto en la síntesis de los TAG de semillas como en la síntesis de lípidos de membrana en tejidos vegetativos. La isoforma *HaLPCAT1* presentó mayor expresión en raíz, tallo, hojas y cotiledones en germinación que en semillas en desarrollo, mientras que los niveles de expresión más altos de *HaLPCAT2* se detectaron en semillas en desarrollo dentro del periodo de acumulación de TAG, que abarca desde los 18 a los 30 DDF (Aznar-Moreno et al., 2013). Esto coincide con lo observado para los genes homólogos de otras plantas, como *Nicotiana benthamiana*, *Brassica napus* y *Ricinus communis*, que también se expresan de forma ubicua en la planta (Zhang et al., 2015; Zheng et al., 2012; Arroyo-Caro et al., 2013; Wang et al., 2012; Schmid et al., 2005; <http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>). *HaLPCAT3*, sin embargo, se expresó únicamente en semillas y, además, sus niveles de expresión durante todo el periodo analizado fueron menores que los de *HaLPCAT1* y *HaLPCAT2*. Este resultado apunta a que las semillas en desarrollo, órganos que soportan altas tasas de síntesis de lípidos, poseen una dotación máxima de las enzimas *LPCAT* para favorecer los flujos acílicos necesarios para la acumulación de TAG de reserva.

4.1.6. SUBCLONACIÓN DE LAS SECUENCIAS COMPLETAS DE LOS GENES *HaLPCAT* EN VECTORES DE EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS

Las tres isoformas de *LPCAT* clonadas codifican para proteínas fuertemente unidas a membrana, con una localización muy probable en el retículo endoplásmico. La caracterización funcional de estas enzimas requiere su expresión en sistemas que permitan una localización y compartimentación similar. Así, se eligió como sistema de expresión al microorganismo *Saccharomyces cerevisiae*, el cual se ha demostrado apropiado para caracterizar otras enzimas implicadas en el metabolismo lipídico de plantas (Zheng et al., 2012; Rodríguez-Rodríguez et al., 2016; González-Mellado et al., 2019).

Para realizar los estudios de complementación y caracterización enzimática fue preciso subclonar los genes *HaLPCAT* en vectores de expresión en levadura. Para ello se partió de las construcciones realizadas previamente en los vectores de clonación; cuyos insertos consistían en las regiones codificantes completas de los distintos genes flanqueadas por las dianas de restricción que se determinaron en el diseño de los oligonucleótidos. Los insertos se extrajeron de los vectores de clonación mediante digestión con endonucleasas y se purificaron mediante electroforesis en gel de agarosa. Los insertos de las construcciones pMBL-T::*HaLPCAT1* y pMBL-T::*HaLPCAT2* se extrajeron con las enzimas *Bam*HI y *Xho*I y el inserto de la construcción pJET1.2::*HaLPCAT3* se extrajo con las enzimas *Eco*RI y *Xho*I.

A continuación, estos insertos se ligaron en los vectores de expresión pYES2 y p423*GPD*, previamente digeridos con las mismas enzimas y purificados mediante electroforesis en gel de agarosa. Con las construcciones obtenidas se transformó *E. coli* y se comprobó que los transformantes contenían en inserto mediante una PCR de colonias con los oligonucleótidos

GAL1F y CYCR (para pYES2) o con los oligonucleótidos *GPDF* y *CYCR2* (para *p423GPD*). Se aisló el ADN plasmídico de varios transformantes y los plásmidos que poseían el inserto se enviaron a secuenciar, confirmándose las identidades de las secuencias clonadas por comparación con las secuencias obtenidas tras la clonación en los vectores de clonación.

4.1.7. ENSAYO DE COMPLEMENTACIÓN CON LISO-PAF

Para confirmar que las enzimas codificadas por los genes putativos *HaLPCAT* eran funcionales se llevó a cabo una prueba de sensibilidad frente al liso-PAF (Chen et al., 2007; Zheng et al., 2012). Este ensayo consiste en la complementación de la actividad aciltransferasa por expresión heteróloga de los genes putativos en levadura en presencia de liso-PAF en el medio. La estirpe de levadura usada fue la Y02431 de *Saccharomyces cerevisiae* ya que, al tener mutado el gen *SLC4*, es deficiente en la actividad *LPCAT* endógena. La prueba de sensibilidad se basa en la inhibición del crecimiento de las levaduras que ejerce, a través de fuertes efectos detergentes, el compuesto liso-PAF cuando no se encuentra acilado. Así, mientras la levadura silvestre tiene la capacidad de incorporar liso-PAF suplementado exógenamente y reutilizarlo dentro de las células (Richard y McMaster, 1998), el mutante Y02431, al ser deficiente en la actividad *LPCAT* endógena, será hipersensible a este compuesto (Chen et al., 2007; Zheng et al., 2012).

El ensayo se realizó tal y como se detalla en el apartado 3.2.1.10., transformando este mutante de levadura con las tres construcciones *pYES2::HaLPCAT* y con el vector vacío y usando como control positivo la levadura S288C sin transformar. La levadura S288C puede crecer en el medio SC-ura usado para este ensayo ya que carece de auxotrofías y es viable en presencia de liso-PAF al poseer actividad *LPCAT*.

Como puede observarse en los resultados presentados en la Figura 30, tanto las células del mutante de levadura Y02431 que expresaban los genes *HaLPCAT*, como las células de la levadura S288C usadas como control positivo, crecieron bien en las placas que contenían liso-PAF. Es decir, estas levaduras fueron capaces de acilar este compuesto, aliviando así su toxicidad. Si bien estas levaduras fueron viables en las dos placas que contenían liso-PAF, en la placa con mayor concentración (10 µg/ml), cuando se sembró con una densidad celular baja, el crecimiento sí se vio afectado.

Por el contrario, el control negativo, es decir, la levadura Y02431 transformada con vector vacío, no fue viable en las placas que contenían liso-PAF, mostrando claramente el efecto tóxico de este compuesto. En la placa control sin liso-PAF pudieron crecer bien todas las levaduras, confirmando que las tres enzimas *HaLPCAT* eran funcionales y capaces de acilar el sustrato exógeno, obteniéndose resultados similares a los previamente publicados con enzimas *LPCAT* de *Brassica napus* (Zheng et al., 2012), *Ricinus communis* (Arroyo-Caro et al., 2013) o *Nicotiana benthamiana* (Zhang et al., 2015) e incluso de la especie humana (Kazachkov et al., 2008). Al confirmarse que los genes clonados poseían actividad *LPCAT* se procedió a realizar un estudio de caracterización bioquímica de dichas enzimas.

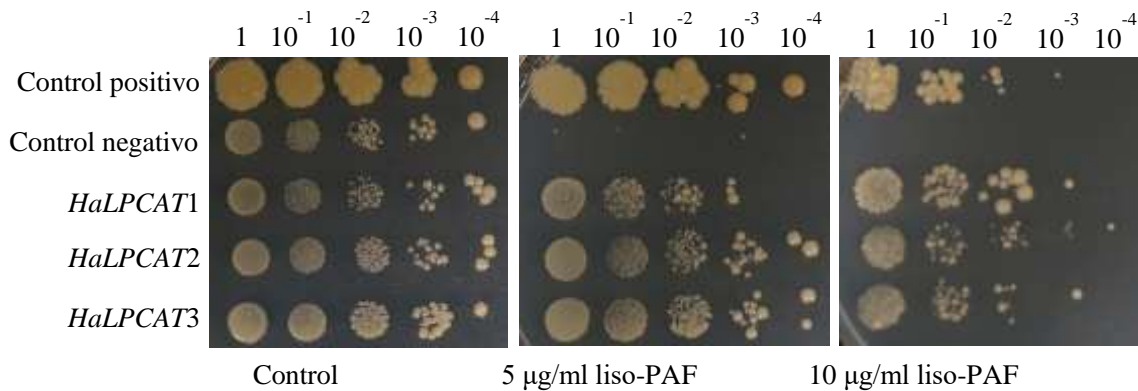


Figura 30. Ensayo de complementación con liso-PAF. Placas sembradas con 10 μ l de diluciones seriadas 1:10 de distintos cultivos de levadura. La primera dilución tiene $DO_{600} = 2$ y la última $DO_{600} = 2 \times 10^{-4}$. Los cultivos corresponden a la levadura S288C sin transformar (control positivo) o a la levadura Y02431 transformada con el plásmido pYES2 vacío (control negativo) o con las construcciones pYES2::*HaLPCAT1*, pYES2::*HaLPCAT2* o pYES2::*HaLPCAT3*. Las placas contienen medio SC-ura con galactosa al 2% (p/v) y rafinosa al 1% (p/v), la segunda placa contiene además, 5 μ g/ml de liso-PAF y la última 10 μ g/ml de liso-PAF. Las placas se incubaron a 30 °C durante 72 h.

4.1.8. ENSAYO DE COMPLEMENTACIÓN CON 5-FOA

Este experimento se realizó para comprobar si los genes *HaLPCAT* clonados eran capaces de acilar LPA, es decir, presentaban también actividad LPAAT, la cual es también importante en el metabolismo de glicerolípidos, formando parte de la ruta de Kennedy (Figura 9). Para ello se realizó un ensayo de complementación de dicha actividad en la estirpe de levadura FBY4137 (3.2.1.10.), que tiene suprimidos los dos genes que codifican para la actividad LPAAT en levadura, SLC1 y SLC4 (Benghezal et al., 2007).

La supresión simultánea de estos genes es letal para la levadura, de forma que para generar el doble mutante Benghezal et al. (2007) transformaron el mutante *slc4* Δ con la construcción pGREG546::*ScSLC1* y posteriormente suprimieron el gen SLC1. El plásmido pGREG546 (Jansen et al., 2005) tiene como marcador el gen *URA3*. Gracias a esto se pudo realizar el ensayo de complementación con 5-FOA, ya que este compuesto, que no es tóxico para las levaduras, se convierte en un compuesto letal en aquellas que expresan el gen *URA3*. Para que la levadura mutante transformada con la construcción pGREG546::*ScSLC1* crezca en presencia de 5-FOA, esta tiene que perder dicha construcción (para evitar la expresión del gen *URA3*). La levadura que pierda esta construcción solo será viable si los genes *HaLPCAT* con los que se ha transformado previamente poseen actividad LPAAT y son capaces, por tanto, de revertir la letalidad de la doble mutación que posee esta estirpe de levadura.

Tras realizar el ensayo como está detallado en el apartado 3.2.1.10. se pudo observar que en presencia de 5-FOA en el medio, las tres enzimas *HaLPCAT* fueron capaces de suprimir la letalidad producida por la carencia de actividad LPAAT en la levadura (Figura 31). Así, en presencia de 5-FOA, la levadura transformada con la construcción p423*GPD*::*HaLPAAT2* (control positivo) pudo crecer, mientras que la levadura transformada con el plásmido p423*GPD* vacío (control negativo), al carecer de actividad LPAAT, no fue viable. En la placa control, que contenía SC-ura-his con galactosa al 2% (p/v), pudieron crecer todas las levaduras (Figura 31). En esta placa, las levaduras transformadas con el vector p423*GPD* vacío o con cualquiera de los insertos pudieron crecer porque poseían la construcción pGREG546::*ScSLC1*. En esta construcción, la expresión de *ScSLC1* estaba controlada por el promotor *GALI*, inducible por

galactosa y por tanto, la presencia de este sacárido en el medio permitió la expresión de este gen que poseía actividad LPAAT. Con el resultado de esta placa se pudo confirmar además, la presencia del vector pGREG546 (que posee el marcador *URA3*), puesto que sin este vector las levaduras no podrían haber crecido ya que en el medio no se añadió uracilo. Esta placa también permitió confirmar la presencia del plásmido p423*GPD* (que posee el marcador *HIS3*) puesto que el medio no contenía histidina.

Los resultados obtenidos con este ensayo de complementación indican que las enzimas *HaLPCAT* además de actividad LPCAT poseen al menos cierta actividad LPAAT y que podrían intervenir en la ruta de síntesis *de novo* de los glicerolípidos además de en la ruta de edición de acilos. Para confirmar estos resultados, en un futuro, podrían realizarse ensayos de actividad LPAAT con preparaciones de membrana de levadura que expresen heterológicamente los genes *HaLPCAT*. Que las enzimas LPCAT tengan afinidad por otros lisofosfolípidos además de por PC, no es una propiedad exclusiva de las enzimas de girasol y se ha observado previamente en otras enzimas LPCAT de plantas como *Arabidopsis thaliana*, *Brassica napus*, *Ricinus communis* y *Nicotiana benthamiana* (Ståhl et al., 2008; Zheng et al., 2012; Arroyo-Caro et al., 2013; Zhang et al., 2015).

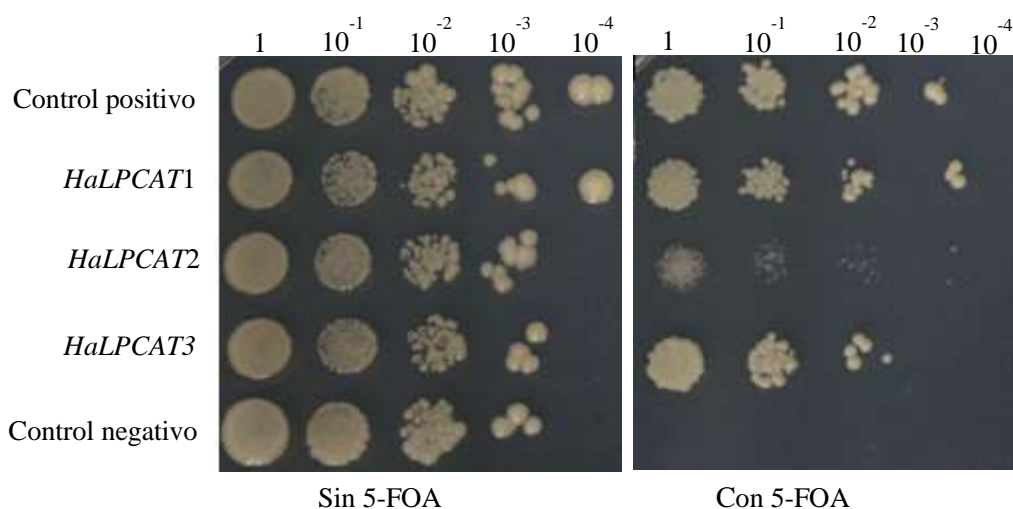


Figura 27. Ensayo de complementación con 5-FOA. Placas sembradas con 10 μ l de diluciones seriadas 1:10 de distintos cultivos de levadura. La primera dilución tiene $DO_{600} = 0.4$ y la última $DO_{600} = 0.4 \times 10^{-4}$. Los cultivos corresponden a la levadura FBY4137 (que contiene la construcción pGREG546::*ScSLC1*, marcador *URA3*) transformada con las construcciones de los genes *HaLPCAT* en el plásmido p423*GPD* (marcador *HIS3*). La levadura albergando el vector vacío se usó como control negativo y la levadura transformada con el gen *HaLPAAT2* en p423*GPD* se usó como control positivo. La placa con 5-FOA contiene medio SC-his con glucosa al 2% (p/v) y 5-FOA al 1% (p/v) y la placa control sin 5-FOA contiene medio SC-ura-his con galactosa al 2% (p/v). Las placas se incubaron a 30 °C durante 72 h.

4.1.9. EFECTO DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES *HaLPCAT* SOBRE LA COMPOSICIÓN DE LÍPIDOS EN LEVADURA

4.1.9.1. Efecto sobre la proporción y el contenido de distintas especies de glicerolípidos de levadura

Después de confirmar su funcionalidad, se realizaron una serie de estudios sobre el impacto de la expresión de los genes *HaLPCAT* en los lípidos y en el conjunto de acil-CoA de levadura.

Dentro de este estudio se introdujo además un nuevo factor, que fue la expresión del gen que codifica para una desaturasa de retículo exógena, en concreto, la desaturasa FAD2 de *Camelina sativa* (*CsFAD2*; Rodríguez-Rodríguez et al., 2016), la cual, expresada en levadura es capaz de producir 18:2 a partir de 18:1 endógeno en una reacción sobre la posición *sn*-2 de PC. El estudio de la distribución del ácido graso 18:2 entre las distintas especies lipídicas puede dar noticia del papel de las enzimas LPCAT en la canalización de ácidos grasos poliinsaturados en girasol. Así, en este apartado, se investigó la composición de glicerolípidos de cultivos de levadura en fase estacionaria expresando los genes *HaLPCAT* mediante HPLC. A continuación, las especies lipídicas más importantes, PC, PE y TAG, fueron aisladas y su composición de ácidos grasos fue analizada mediante cromatografía de gases.

La línea de levadura empleada en estos estudios fue la Y02431 (*ale1*Δ), la cual carece de LPCAT endógenas que pudieran interactuar con las formas que se pretenden estudiar. Así, se llevaron a cabo dos series de experimentos, en uno de ellos solo se expresaron los genes *HaLPCAT*, mientras que en el segundo se coexpresó, con los mencionados genes, el gen *CsFAD2*. Las líneas control se transformaron con los plásmidos *p423GPD* y *p416GPD* vacíos. El método empleado permitió la cuantificación de las especies de lípidos neutros y polares mayoritarios en levadura, TAG, CL, PE, PC, PS y PI. Los análisis se llevaron a cabo con tres replicados biológicos.

La cantidad total de lípidos polares no cambió de manera significativa en las líneas investigadas, permaneciendo entre 23.3 y 39.0 μg/ml cultivo, mostrando a veces una considerable variabilidad en sus valores (Tabla 6). Sin embargo, la proporción relativa de los diferentes lípidos polares permaneció mucho más estable. En la primera serie de datos, donde no se expresó *CsFAD2*, se observaron solo cambios menores. Las únicas diferencias recayeron en los porcentajes de PC y PI cuando se expresó *HaLPCAT2*, implicando una subida del segundo a expensas del primero y un aumento significativo de la proporción de PE cuando se expresó *HaLPCAT3*. En la segunda serie de muestras, con coexpresión de *CsFAD2*, también se observó un leve incremento, pero no significativo, de PE cuando se expresó *HaLPCAT3*, de forma que los únicos cambios significativos observados fueron bajo la expresión de *HaLPCAT2*. Estos cambios afectaron también a PC y PI, pero en este caso la variación fue la contraria, observándose un incremento de PC a costa de PI. Estos resultados indican que, aunque las proteínas *HaLPCAT*, mostraron un alto grado de identidad, parecen actuar de manera diferente cuando se expresan en levadura.

Los cambios en la proporción de PC y PI son difíciles de interpretar ya que la síntesis de estos dos compuestos no está directamente interconectada. Así, el PI se produce a partir de CDP-DAG, cuyo precursor es el PA, mientras que el precursor directo de la PC son los DAG. En cualquier caso, el incremento en el contenido de PI podría ser una respuesta al estrés causado por la expresión de la enzima, que podría alterar de algún modo las membranas de la levadura. La implicación de PI y de su metabolismo en la respuesta al estrés en levaduras ha sido previamente descrita en respuesta a altas concentraciones de etanol y el estrés osmótico (Chi et al., 1999; Bonangelino et al., 2002). A este respecto, resulta interesante que en presencia de la desaturasa *CsFAD2* el efecto observado sea el contrario, registrándose un incremento de la PC en presencia de *HaLPCAT2* a expensas de PI. En este caso parece que el incremento en la fluidez de las membranas causada por la presencia de 18:2 alteró la respuesta observada en el segundo experimento.

Tabla 6. Proporción y contenido de especies de lípidos polares en la cepa de levadura Y02431 (*ale1Δ*) que expresa los genes *HaLPCAT* en presencia o ausencia de expresión de la enzima oleato desaturasa de *Camelina sativa* (*CsFAD2*).

	Contenido total ($\mu\text{g/ml}$ cultivo)	CL	PE	% PC	PS	PI
p423GPD p416GPD	23.3 \pm 7.2	1.3 \pm 0.6	14.1 \pm 3.0	54.4 \pm 2.5	5.8 \pm 0.9	24.4 \pm 5.7
p423GPD:: <i>HaLPCAT1</i> p416GPD	33.1 \pm 4.5	2.1 \pm 1.2	15.0 \pm 1.9	53.7 \pm 2.1	6.1 \pm 1.8	23.2 \pm 3.4
p423GPD:: <i>HaLPCAT2</i> p416GPD	32.2 \pm 5.9	1.0 \pm 0.2	11.5 \pm 1.4	47.1 \pm 1.7*	7.9 \pm 2.6	32.5 \pm 1.9*
p423GPD:: <i>HaLPCAT3</i> p416GPD	24.4 \pm 5.1	1.4 \pm 0.4	20.5 \pm 1.1*	52.9 \pm 1.3	4.3 \pm 0.4	20.9 \pm 2.1
p423GPD p416GPD:: <i>CsFAD2</i>	29.3 \pm 8.5	1.0 \pm 0.4	15.0 \pm 4.1	48.4 \pm 5.7	5.1 \pm 1.2	30.5 \pm 9.3
p423GPD:: <i>HaLPCAT1</i> p416GPD:: <i>CsFAD2</i>	39.0 \pm 13.7	1.1 \pm 0.4	12.3 \pm 2.7	48.2 \pm 3.5	4.9 \pm 0.7	33.6 \pm 3.0
p423GPD:: <i>HaLPCAT2</i> p416GPD:: <i>CsFAD2</i>	29.9 \pm 13.1	1.2 \pm 0.6	15.7 \pm 2.9	60.9 \pm 4.9*	5.1 \pm 0.6	17.1 \pm 2.9*
p423GPD:: <i>HaLPCAT3</i> p416GPD:: <i>CsFAD2</i>	27.9 \pm 3.3	1.9 \pm 0.8	19.5 \pm 0.7	53.9 \pm 2.4	4.3 \pm 0.3	20.3 \pm 1.3

Los genes *HaLPCAT* se expresaron en el plásmido p423GPD, mientras que *CsFAD2* se expresó en el plásmido p416GPD. Las líneas control contuvieron los plásmidos vacíos. Los datos son la media de cuatro determinaciones independientes \pm desviación estándar. Los asteriscos indican diferencias significativas con las células control de acuerdo a un ANOVA unidireccional con análisis de Tuckey *post hoc* con un nivel de significancia del 0.05%. CL: cardiopina; PE: fosfatidiletanolamina; PC: fosfatidilcolina; PS: fosfatidilserina; PI: fosfatidilinositol.

Aunque los lípidos polares son esenciales para un correcto funcionamiento y desarrollo de las levaduras no son los glicerolípidos más abundantes en cultivos estacionarios. Así, la proporción de TAG en estos cultivos fue de 2 a 3 veces mayor que la suma de los otros glicerolípidos. Además, el impacto de la enzima *HaLPCAT* en la cantidad acumulada de TAG en levadura puede dar noticia de su posible papel en la síntesis de TAG en girasol. El efecto de la expresión de *HaLPCAT* en las cantidades de TAG acumuladas se muestra en la Figura 32, donde se aprecia que afectaron de manera diferente a los niveles de estos lípidos.

Cuando el experimento se llevó a cabo sin la expresión de *CsFAD2*, se observó un incremento significativo del contenido de TAG en los cultivos expresando *HaLPCAT1* y *HaLPCAT3*, que se aumentó desde los 60 a los 90 μg TAG/ml cultivo, un incremento del 50% (Figura 32A). Este aumento significativo no se observó al expresar *HaLPCAT2*. Cuando la desaturasa de Camelina fue expresada este efecto sobre el contenido de TAG no fue tan evidente (Figura 32B), observándose un incremento del contenido de TAG causado por la expresión de *HaLPCAT1*, aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa.

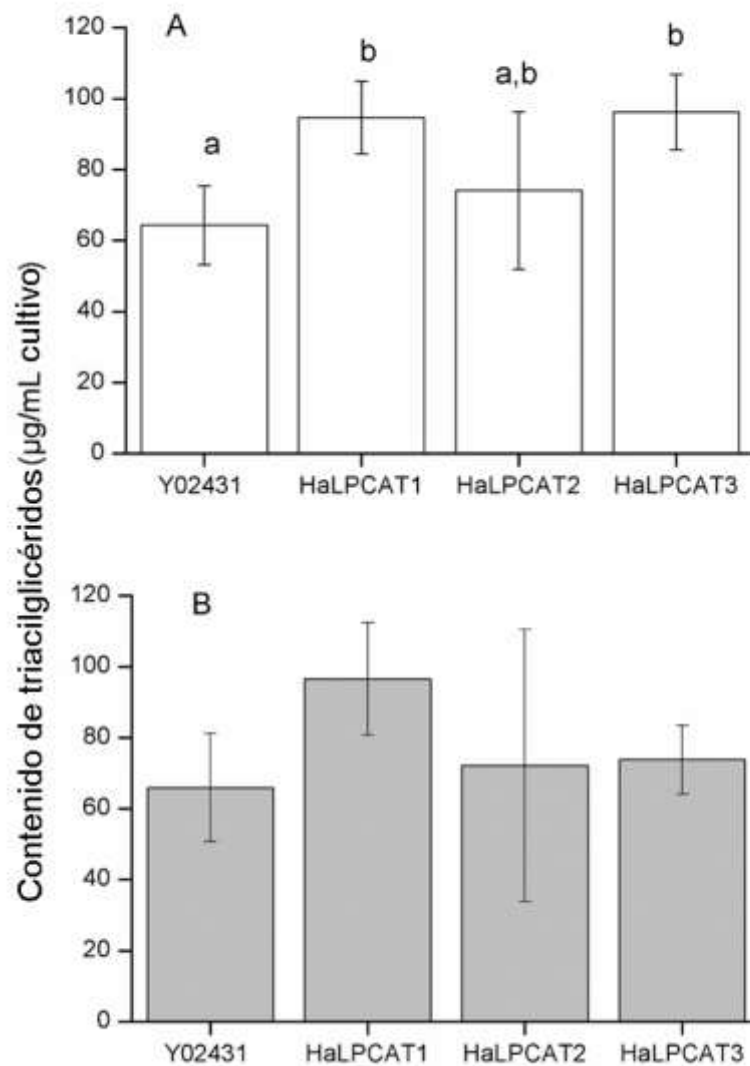


Figura 28. Contenido de triacilglicéridos de cultivos de la levadura Y02431 (*ale1Δ*) expresando los genes *HaLPCAT* en ausencia (A) o presencia (B) de expresión de oleato desaturasa de *Camelina sativa* (*CsFAD2*). Los datos son la media de cuatro determinaciones independientes \pm desviación estándar. Las letras indican agrupaciones estadísticas con un nivel de significancia del 0.05%. En la figura B todas las muestras pertenecieron a la misma agrupación estadística.

El incremento de TAG observado al expresar los genes *HaLPCAT* podría ser causado por un mecanismo de la célula destinado a equilibrar la proporción de PC con objeto de mantener la homeostasis en las membranas. De forma que una manera de reducir el impacto de la actividad de estas enzimas sería favorecer la producción de TAG a partir de PC mediante la enzima PDAT, o disminuyendo el tamaño del conjunto de acil-CoAs vía acilación de DAG a través de la enzima DGAT. Cuando se coexpresó *CsFAD2* con *HaLPCAT* quizás las levaduras registraron un descenso en la capacidad biosintética por tener que mantener la expresión de dos plásmidos, no siendo capaz de incrementar el contenido de TAG. Este efecto en el contenido de TAG no había sido descrito hasta el día de hoy en levaduras expresando otras enzimas LPCAT.

4.1.9.2 Efecto sobre la composición de ácidos grasos de distintas especies de glicerolípidos de levadura

La composición de ácidos grasos de la fracción de TAG y de los lípidos polares más directamente implicados en la reacción de LPCAT (PE y PC) se investigó en los lípidos de levadura expresando *HaLPCAT* y *CsFAD2* en experimentos llevados a cabo de manera similar al estudio anterior. Analizar estos cambios en la composición acífica de la levadura podría dar información acerca de la contribución de estas enzimas a los flujos de acilos entre las diferentes especies de glicerolípidos. Los cambios inducidos por la expresión de *HaLPCAT* sobre la composición de ácidos grasos de las mencionadas especies se muestran en la Tabla 7. Cuando la desaturasa *CsFAD2* no fue expresada solo estuvieron presentes los ácidos grasos propios de los lípidos de levadura, ácidos grasos saturados y monoinsaturados Δ^9 o Δ^{11} (Stukey et al., 1989). Los ácidos grasos que mostraron mayores variaciones fueron los ácidos grasos ω -7 16:1 ^{Δ^9} y 18:1 ^{Δ^{11}} . Así, *HaLPCAT1* indujo incrementos significativos en 16:1 ^{Δ^9} en TAG y PC a expensas de 16:0. Esta forma también incrementó el contenido de 18:1 ^{Δ^9} en PC. En el caso de *HaLPCAT2* su efecto parece ser contrario al de *HaLPCAT1*, causando incrementos en la proporción de 16:0 y disminución de 16:1 ^{Δ^9} en PC y PE, no afectando a los TAG. Las 3 formas de LPCAT indujeron descensos en 18:1 ^{Δ^{11}} en todas las especies de glicerolípidos estudiadas (Tabla 7). Los ácidos grasos ω -7 en levadura se forman por acción de una enzima acil-CoA desaturasa que actúa sobre 16:0-CoA, lo que da lugar a 16:1 ^{Δ^9} -CoA, que a continuación es elongado a 18:1 ^{Δ^{11c}} -CoA por acción del complejo ácido graso sintetasa. La explicación para los cambios en la distribución de ácidos grasos observada la podría dar el incremento del recambio o *turnover* de 16:1 ^{Δ^9} entre los lípidos y el conjunto de acil-CoA, lo que disminuiría la disponibilidad de este sustrato para las enzimas ácido graso sintetasas o para las elongasas. Por otro lado, la enzima *HaLPCAT1* incrementó la concentración de 16:1 ^{Δ^9} en PC y TAG y de 18:1 ^{Δ^9} en PC, apuntando a una contribución importante al intercambio de ácidos grasos monoinsaturados entre el conjunto de acil-CoA y sobre la fracción de fosfolípidos. Este efecto no se observó en las otras dos formas que sí contribuyeron por lo demás al descenso de 18:1 ^{Δ^{11}} en todas las especies lipídicas estudiadas.

La expresión de *CsFAD2* junto con los genes *HaLPCAT* permitió examinar el papel de estas últimas enzimas en el metabolismo y distribución de los ácidos grasos poliinsaturados (Tabla 7). Así, a diferencia del oleato, el ácido graso 18:2 ^{$\Delta^{9,12}$} es sintetizado por desaturación de su precursor esterificado a PC a través de una desaturasa de membrana, por lo que para su incorporación a otras especies necesita mecanismos de edición y transferencia de acilos. La expresión de *CsFAD2* incrementó la complejidad la composición de ácidos grasos de los lípidos de levadura debido a que aparecieron varios ácidos grasos poliinsaturados como consecuencia de la actividad de esta enzima, siendo 18:2 ^{$\Delta^{9,12}$} y 16:2 ^{$\Delta^{9,12}$} y pequeñas cantidades de 18:2 ^{$\Delta^{11,14}$} , producido por elongación de 16:2 ^{$\Delta^{9,12}$} (Tabla 7). En las levaduras control, los ácidos grasos poliinsaturados estuvieron presentes sobre todo en PC y en TAG, con muy poca incorporación en PE. El efecto de la expresión de *CsFAD2* produjo por otra parte un considerable incremento en la proporción de ácidos grasos saturados en los fosfolípidos estudiados. En un trabajo previo, también observaron un aumento de los ácidos grasos saturados al sobreexpresar esta misma enzima en *S. cerevisiae* (Rodríguez-Rodríguez et al., 2016), siendo probablemente un mecanismo de la levadura para compensar y equilibrar la fluidez de las membranas, que se ve alterada por la presencia de los ácidos grasos poliinsaturados. La expresión de *HaLPCAT1* indujo un considerable incremento de la incorporación de 18:2 ^{$\Delta^{9,12}$} y de poliinsaturados totales tanto en TAG como en PC y PE. Este incremento tuvo lugar a costa de los demás ácidos grasos. El efecto de *HaLPCAT1* sobre los ácidos grasos ω -7 también se observó en presencia de la desaturasa. El efecto de las otras dos enzimas *HaLPCAT* fue menos claro y más difícil de interpretar. Ambas causaron incrementos en la incorporación de 18:2 ^{$\Delta^{9,12}$} en PE, aunque el impacto sobre la incorporación de los ácidos grasos poliinsaturados en las otras especies de glicerolípidos no fue claro.

Tabla 7. Composición de ácidos grasos de la fracción de triacilgliceroles (TAG), fosfatidil etanolamina (PE) y fosfatidilcolina (PC) de la línea Y02431 expresando los genes *HaLPCAT* en presencia (*CsFAD2+*) o ausencia (*CsFAD2-*) de expresión de la oleato desaturasa de *Camelina sativa*.

		Composición (%)								
<i>CsFAD2-</i>		16:0	16:1 ^{A9}	16:2 ^{A9,12}	18:0	18:1 ^{A9}	18:1 ^{A11}	18:2 ^{A9,12}	18:2 ^{A11,14}	
TAG	Control	20.9 ± 1.0	42.8 ± 1.4	nd	9.2 ± 0.4	19.1 ± 1.5	8.0 ± 1.3	nd	nd	
	<i>HaLPCAT1</i>	17.1 ± 3.4	52.0 ± 5.3*	nd	6.3 ± 1.5	20.3 ± 2.2	4.4 ± 0.9*	nd	nd	
	<i>HaLPCAT2</i>	23.1 ± 7.4	41.1 ± 4.7	nd	9.5 ± 2.1	22.0 ± 4.5	4.3 ± 1.1*	nd	nd	
	<i>HaLPCAT3</i>	19.8 ± 2.0	42.6 ± 0.7	nd	10.9 ± 0.8	22.0 ± 2.1	4.6 ± 1.0*	nd	nd	
PE	Control	45.5 ± 0.4	18.4 ± 4.8	nd	12.8 ± 8.5	18.3 ± 1.8	4.9 ± 1.5	nd	nd	
	<i>HaLPCAT1</i>	47.9 ± 4.1	21.0 ± 1.7	nd	13.3 ± 4.7	15.2 ± 2.9	2.7 ± 0.3*	nd	nd	
	<i>HaLPCAT2</i>	61.9 ± 1.3*	8.1 ± 1.4*	nd	13.5 ± 2.0	14.4 ± 2.0	2.3 ± 1.1*	nd	nd	
	<i>HaLPCAT3</i>	42.6 ± 3.9	17.6 ± 4.4	nd	22.1 ± 9.4	15.0 ± 1.8	2.8 ± 0.4*	nd	nd	
PC	Control	38.6 ± 5.3	21.2 ± 2.8	nd	13.3 ± 2.0	19.7 ± 3.5	7.2 ± 2.3	nd	nd	
	<i>HaLPCAT1</i>	24.9 ± 1.4*	31.6 ± 1.8*	nd	11.3 ± 1.4	27.6 ± 1.4*	4.6 ± 1.1*	nd	nd	
	<i>HaLPCAT2</i>	61.1 ± 1.3*	8.1 ± 1.4*	nd	13.3 ± 2.0	12.9 ± 2.0	4.7 ± 4.3*	nd	nd	
	<i>HaLPCAT3</i>	28.4 ± 5.7	26.9 ± 6.1	nd	15.9 ± 3.7	24.2 ± 3.8	4.7 ± 1.2*	nd	nd	
<i>CsFAD2+</i>		16:0	16:1 ^{A9}	16:2 ^{A9,12}	18:0	18:1 ^{A9}	18:1 ^{A11}	18:2 ^{A9,12}	18:2 ^{A11,14}	Total PUFA
TAG	Control	20.8 ± 3.8	37.5 ± 4.5	5.5 ± 1.4	9.2 ± 1.5	11.5 ± 1.8	3.2 ± 1.0	11.6 ± 2.4	0.6 ± 0.3	17.8 ± 2.8
	<i>HaLPCAT1</i>	18.5 ± 3.2	32.6 ± 5.3	8.0 ± 2.3	10.3 ± 1.1	9.5 ± 1.8	1.9 ± 0.5*	18.2 ± 3.8*	1.0 ± 0.4	27.2 ± 4.4*
	<i>HaLPCAT2</i>	22.7 ± 3.7	35.0 ± 7.2	4.6 ± 2.0	12.1 ± 3.8	11.0 ± 2.8	3.1 ± 0.8	10.9 ± 1.1	0.5 ± 0.2	16.1 ± 2.3
	<i>HaLPCAT3</i>	19.0 ± 2.2	36.9 ± 4.2	6.2 ± 1.5	9.9 ± 1.5	9.2 ± 0.9	4.8 ± 1.3	13.1 ± 1.4	0.9 ± 0.2	20.2 ± 2.1
PE	Control	76.3 ± 4.2	5.5 ± 2.3	0.0 ± 0.0	14.5 ± 2.7	3.3 ± 0.3	0.0 ± 0.0	0.4 ± 0.1	0.0 ± 0.0	0.4 ± 0.1
	<i>HaLPCAT1</i>	50.8 ± 6.1*	16.5 ± 2.4*	1.5 ± 0.4*	14.3 ± 2.2	6.4 ± 2.4	0.5 ± 0.7	10.0 ± 1.1*	0.0 ± 0.0	11.5 ± 1.2*
	<i>HaLPCAT2</i>	72.5 ± 4.4	6.2 ± 1.8	0.0 ± 0.0	16.3 ± 2.5	2.7 ± 3.4	0.5 ± 0.7	1.8 ± 1.2	0.0 ± 0.0	1.8 ± 1.2
	<i>HaLPCAT3</i>	53.1 ± 4.0*	21.2 ± 2.1*	0.4 ± 0.1*	7.9 ± 2.7*	11.7 ± 3.6*	1.9 ± 0.7*	3.8 ± 0.6*	0.0 ± 0.0	4.2 ± 0.6*
PC	Control	45.1 ± 8.1	15.7 ± 4.9	2.2 ± 0.9	20.2 ± 2.4	6.9 ± 1.7	1.8 ± 0.5	7.8 ± 3.5	0.3 ± 0.1	10.4 ± 3.6
	<i>HaLPCAT1</i>	33.8 ± 3.8*	21.9 ± 6.6	3.5 ± 1.4	19.5 ± 5.3	7.1 ± 2.0	1.5 ± 0.5	12.1 ± 3.2	0.5 ± 0.2	16.1 ± 3.5
	<i>HaLPCAT2</i>	51.6 ± 4.9	8.7 ± 4.0	0.8 ± 0.2	28.4 ± 2.5	5.7 ± 2.8	1.3 ± 0.6	3.3 ± 0.2	0.2 ± 0.0	4.2 ± 0.3
	<i>HaLPCAT3</i>	31.6 ± 1.3*	25.4 ± 1.5*	2.5 ± 1.0	16.5 ± 0.8	9.0 ± 1.9	4.6 ± 0.4*	10.0 ± 0.6	0.5 ± 0.1	13.0 ± 1.2

Los datos son la media de cuatro determinaciones independientes más menos desviación estándar. Los asteriscos indican diferencias significativas con las células control de acuerdo a un ANOVA unidireccional con análisis de Tuckey *post hoc* con un nivel de significancia del 0.05%. nd: no detectado.

Estos resultados indican que las enzimas *HaLPCAT* pueden tener influencia en la proporción y composición de ácidos grasos de los lípidos de levadura. Sin embargo, y a pesar de sus altos grados de homología, sus efectos parecen ser diferentes. La forma *HaLPCAT1* fue la que indujo un incremento más claro de la canalización de ácidos grasos poliinsaturados a los lípidos de reserva, mientras que *HaLPCAT2* y *HaLPCAT3* no mostraron un efecto tan evidente. Estos resultados, especialmente los concernientes a *HaLPCAT1* confirman el papel de estas enzimas dentro del proceso de síntesis y acumulación de ácidos grasos poliinsaturados (Abbadi et al., 2004).

4.1.10. ANÁLISIS DEL CONJUNTO DE ACIL-CoAs

La enzima LPCAT, involucrada en los procesos de edición de acilo, tiene como sustratos tanto a glicerolípidos, principalmente PC, como a acil-CoAs. Por ello, tras estudiar la influencia de LPCAT en los glicerolípidos de levadura se procedió a estudiar su impacto en el conjunto de acil-CoAs de estos microorganismos. Los acil-CoAs son metabolitos clave en la biosíntesis de glicerolípidos ya que actúan como donantes de acilo en la síntesis de *novo* de TAG, en la edición de acilo de fosfolípidos y en las modificaciones de los restos acilo (Aznar-Moreno et al., 2013; Bates et al., 2009; Bao et al., 1998). Por tanto, la composición del conjunto de acil-CoAs es altamente dinámica y representa un resultado neto tanto de la síntesis de *novo* como de los procesos de edición de acilo y de transferencia de los mismos (Bates et al., 2009; Yurchenko et al., 2014).

De esta forma, LPCAT puede tener influencia en la composición del conjunto de acil-CoAs al catalizar la acilación dependiente de acil-CoA en la posición *sn-2* de la molécula de LPC para formar PC (Stymne y Stobart, 1984). Estos grupos acilos esterificados en PC pueden convertirse en sustratos para la desaturación u otras modificaciones de ácidos grasos (Miquel y Browse, 1992; Broun et al., 1998) y, posteriormente, volver al reservorio de acil-CoA o bien canalizarse hacia la síntesis de TAG mediante mecanismos independientes de acil-CoA (Stobart et al., 1997; Banaś et al., 2000; Dahlqvist et al., 2000; Yurchenko et al., 2014).

La eficiencia que tenga la enzima LPCAT para incorporar acil-CoAs en la molécula de PC determinará la composición de ácidos grasos del conjunto de acil-CoAs y, en última instancia, podrá afectar también a la composición de los ácidos grasos de TAG, ya que, como se ha indicado anteriormente, la síntesis de TAG ocurre, en parte, a través de una serie de acilaciones dependientes de acil-CoA (Snyder et al., 2009; Weselake et al., 2009). De hecho, un intercambio de acilo deficiente entre PC y el conjunto de acil-CoAs en células de semillas en desarrollo de cultivos oleaginosos se identificó como uno de los principales impedimentos para la acumulación de ácidos grasos inusuales producidos por hidroxilasas, conjugasas, epoxidasas o desaturasas (Cahoon et al., 2007; Aznar-Moreno et al., 2013). Por lo tanto, analizar si el conjunto de acil-CoAs se ve afectado tras la expresión de esta enzima podría proporcionar información útil sobre el papel que juega en el metabolismo de los ácidos grasos presentes en los TAG.

La planificación de los experimentos fue análoga a la realizada en el apartado anterior, empleándose la línea de levadura Y02431 (*ale1Δ*) y los plásmidos *p423GPD* y *p416GPD* para la expresión de *HaLPCAT* y *CsFAD2*, respectivamente. Los controles se realizaron estudiando líneas de levadura que portaban los plásmidos vacíos. El análisis se realizó con cuatro replicados biológicos.

Cuando los genes *HaLPCAT* se expresaron en ausencia de la desaturasa, la composición del conjunto de acil-CoAs se vio alterada en cierta medida en comparación con la de la cepa

Tabla 8. Composición del conjunto de acil-CoAs de la cepa mutante de levadura Y02431 que expresa heterológamente los genes *HaLPCAT* en presencia o ausencia de expresión del gen oleato desaturasa de *Camelina sativa* (*CsFAD2*).

	Composición (% mol)				
	16:0-CoA	16:1-CoA	18:0-CoA	18:1-CoA	18:2-CoA
p416GPD/ p423GPD	36.1 ± 5.2	23.1 ± 2.7	17.4 ± 0.8	23.4 ± 3.5	nd
p416GPD/ p423GPD:: <i>LPCAT1</i>	29.6 ± 6.4	28.8 ± 2.8	16.9 ± 1.6	24.8 ± 5.8	nd
p416GPD/ p423GPD:: <i>LPCAT2</i>	29.4 ± 8.1	27.0 ± 9.6	12.9 ± 2.4*	30.7 ± 3.9*	nd
p416GPD/ p423GPD:: <i>LPCAT3</i>	30.6 ± 10.3	21.9 ± 7.2	15.2 ± 4.8	32.3 ± 9.5*	nd
p416GPD:: <i>CsFAD2</i> / p423GPD	41.5 ± 2.5	20.0 ± 1.0	19.2 ± 2.1	11.0 ± 2.3	8.3 ± 1.9
p416GPD:: <i>CsFAD2</i> / p423GPD:: <i>LPCAT1</i>	40.2 ± 2.0	17.6 ± 3.7	22.1 ± 3.9	6.3 ± 1.6*	13.8 ± 2.2*
p416GPD:: <i>CsFAD2</i> / p423GPD:: <i>LPCAT2</i>	39.8 ± 6.5	15.7 ± 3.7	21.2 ± 2.9	7.3 ± 0.9*	16.0 ± 6.4
p416GPD:: <i>CsFAD2</i> / p423GPD:: <i>LPCAT3</i>	31.9 ± 10.9	17.8 ± 3.5	15.9 ± 6.6	13.9 ± 5.3	20.6 ± 4.2*

Como control se usó la levadura transformada con los plásmidos p423GPD y p416GPD vacíos. Los datos representan la media de cuatro determinaciones independientes más menos desviación estándar. Los asteriscos indican diferencias significativas con las células control de acuerdo a un ANOVA unidireccional con análisis de Tuckey *post hoc* con un nivel de significancia del 0.05%. nd: no detectado.

control. Así, en presencia de *HaLPCAT* se observaron descensos en la proporción de acil-CoAs saturados (16:0 y 18:0) a expensas de los monoinsaturados (16:1 y 18:1). Estos cambios, sin embargo, estuvieron sometidos a cierta variabilidad y no fueron siempre significativos. Así, solo la expresión de *HaLPCAT2* y *HaLPCAT3* indujo incrementos significativos de la proporción de 18:1-CoA en esta serie de experimentos (Tabla 8).

La expresión heteróloga de *CsFAD2* indujo importantes cambios en el conjunto de acil-CoAs. Al igual que cuando se estudió la composición los glicerolípidos, el efecto más notable fue la aparición de 18:2-CoA, resultado de la reacción de desaturación de 18:1 que cataliza esta enzima. Este acil-CoA no se detectó en la levadura que portaba los vectores vacíos debido a que esta carece de enzimas necesarias para introducir más de un doble enlace en los ácidos grasos (Stukey et al., 1989). Es de reseñar que en este caso no se detectaron derivados poliinsaturados diferentes al 18:2-CoA, lo cual podría deberse a que se encontraban en muy baja concentración en este conjunto de metabolitos o a que el método cromatográfico no permitió diferenciarlos de otros picos mayoritarios. Así, la proporción en la que apareció este nuevo componente en las células control, como consecuencia de la desaturación del oleato endógeno, fue del 8.3%, induciendo un descenso del mencionado oleato y un leve incremento de los derivados saturados.

La coexpresión de los genes *HaLPCAT* produjo a su vez un claro enriquecimiento del conjunto en 18:2-CoA, el cual fue significativo en el caso de *HaLPCAT1* y *HaLPCAT3*, produciéndose al mismo tiempo una bajada de los derivados monoinsaturados 18:1-CoA y 16:1-CoA. En el caso de *HaLPCAT2* también se observó el mencionado efecto, aunque las determinaciones estuvieron sujetas a una alta variabilidad, lo que hizo que las diferencias con el control no fueran significativas. Sin embargo, cuando se compararon las proporciones de 18:1-CoA y 18:2-CoA en términos de grado de conversión aparente, sí se observaron diferencias significativas causadas por la expresión de las 3 formas *LPCAT* (Tabla 9).

Este resultado demostró, de nuevo, que las 3 formas clonadas de LPCAT de girasol son enzimas funcionales en levadura, capaces de alterar su composición y sus conjuntos de metabolitos, resultado que estuvo acorde con los publicados por Wang et al. (2012), que mostraron cambios en el conjunto de acil-CoAs de Arabidopsis causados por enzimas LPCAT. Este resultado y los previamente descritos para los glicerolípidos indican que en presencia de desaturasas de retículo estas enzimas actúan incrementando el flujo de ácidos grasos poliinsaturados entre PC y los demás lípidos y metabolitos, contribuyendo a un correcto flujo de estos importantes componentes de las membranas y de los lípidos de reserva. Estos resultados están acordes con estudios previos que investigaban las limitaciones que se encuentran en plantas transgénicas para incrementar la cantidad de ácidos grasos poliinsaturados, entre las cuales es de gran importancia favorecer un correcto intercambio de los acilos desaturados desde la PC, donde son producidos, a todas las demás especies de glicerolípidos de la planta (Abbadí et al., 2004). Esta circulación de PUFA es también importante desde el punto de vista adaptativo, ya que la composición de PUFA de las membranas juega un papel importante en la adaptación de las plantas a distintas condiciones medioambientales (O'Quin et al., 2010; Menard et al., 2017), siendo esos mismos ácidos grasos sustratos primarios para la producción de gran variedad de metabolitos de regulación a través de la cascada de reacciones de la lipoxigenasa (Feussner y Wasternack, 2002).

Tabla 9. Porcentajes de conversión de 18:1-CoA a 18:2-CoA en la cepa mutante de *Saccharomyces cerevisiae* Y02431 (ale1Δ) que expresa heterológamente los genes *HaLPCAT* y/o *CsFAD2*.

Construcción	% Conversión aparente 18:1-CoA/18:2-CoA
p416GPD::CsFAD2+ p423GPD	43.0 ± 7.0
p416GPD::CsFAD2 + p423GPD::LPCAT1	68.7 ± 5.0*
p416GPD::CsFAD2 + p423GPD::LPCAT2	68.7 ± 10*
p416GPD::CsFAD2 + p423GPD::LPCAT3	59.7 ± 6.0*

Los genes *HaLPCAT* se expresaron en el plásmido p423GPD y el gen *CsFAD2* en el plásmido p416GPD. 18:1-CoA (oleil-CoA, 18:1^{Δ9c}-CoA); 18:2-CoA (linoleil-CoA, 18:2^{Δ9c,12c}-CoA). Los datos representan la media de cuatro réplicas biológicas independientes más menos la desviación estándar. Los asteriscos indican diferencias significativas con las células control de acuerdo a un ANOVA unidireccional con análisis de Tuckey *post hoc* con un nivel de significancia del 0.05%.

4.1.11. CARACTERIZACIÓN *IN VITRO* DE LAS ENZIMAS *HaLPCAT*

Los ensayos de complementación y los estudios de composición lipídica previos indicaron claramente que las enzimas LPCAT de girasol eran activas cuando se expresaron en la línea levadura Y02431 (ale1Δ). Este sistema, al carecer de LPCAT endógena, es muy apropiado para realizar estudios *in vitro* de estas enzimas sin la posible distorsión de actividades endógenas. Teniendo en cuenta que en las secuencias de las tres isoformas clonadas se encontraron varios dominios de transmembrana y que mostraron una muy posible localización en el retículo endoplásmico, se decidió llevar a cabo este estudio con las fracciones microsomales de levaduras que expresaban heterológamente estas proteínas. Para estos experimentos se emplearon fracciones microsomales ya que los intentos de solubilización y purificación que se llevaron a cabo produjeron una rápida pérdida de toda actividad. Esto probablemente se deba a que al ser estas proteínas integrales de membrana, la solubilización de las mismas altera sus estructuras y, por tanto, sus actividades. Las actividades de enzimas LPCAT de varias plantas, como *Nicotiana benthamiana*, *Brassica napus*, *Ricinus communis*, *Hiptage benghalensis*, *Lesquerella fendleri*, *Carthamus tinctorius* y *Arabidopsis thaliana*, habían sido estudiadas en las mismas fracciones (Zhang et al., 2015; Zheng et al., 2012; Arroyo-Caro et al., 2013; Lager et al., 2013).

Para determinar las condiciones óptimas del ensayo de la reacción directa (Figura 33), se estudió la dependencia de la actividad con el tiempo de reacción y con la cantidad cargada de proteínas microsomales. Para ello se llevaron a cabo, por triplicado, reacciones con preparaciones de membrana de la levadura transformada con la construcción pYES2::*HaLPCAT1*, pYES2::*HaLPCAT3* o con el vector vacío como control, usando como sustratos 18:1-CoA y *sn*-1-[1-¹⁴C]-18:1-LPC siguiendo el protocolo detallado en Materiales y Métodos. Con la isoforma *HaLPCAT2* no se llevaron a cabo estas reacciones de optimización, pues se comportó de manera similar a *HaLPCAT1* en replicados sencillos realizados en los mismos intervalos, los cuales no se han incluido en esta memoria.

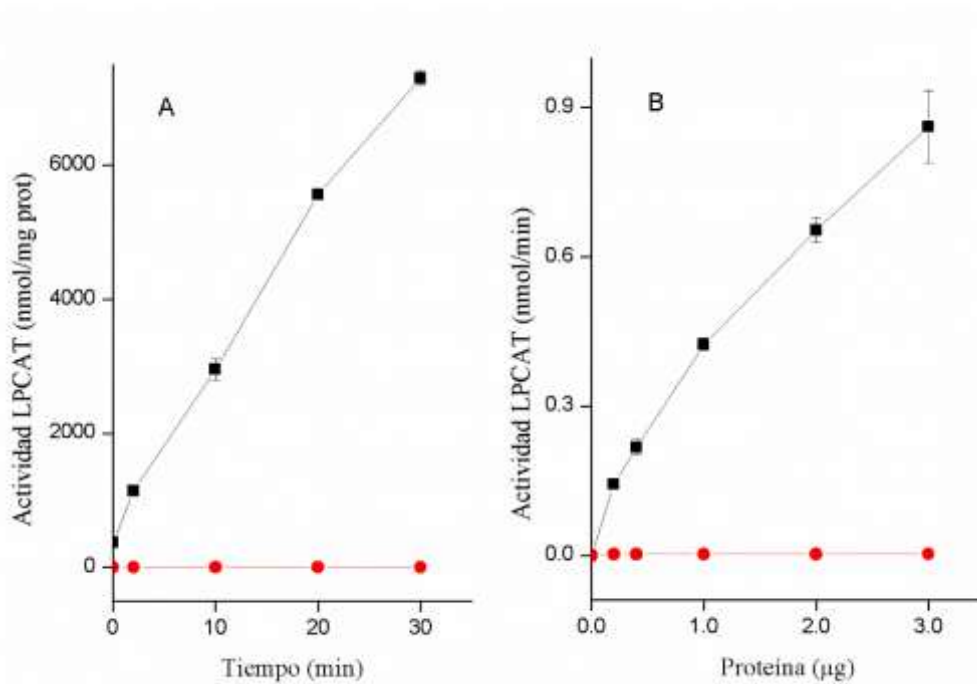


Figura 29. Estudios de la influencia del tiempo de reacción (A) y de la cantidad de proteína (B) en la actividad *HaLPCAT1* en la reacción directa, ensayada en microsomas de levadura. Actividad LPCAT expresada como la cantidad de PC formada menos la cantidad obtenida en reacciones a tiempo cero, en nanomol por miligramo de proteína (A) o por minuto de reacción (B). Los datos representan el valor medio de tres ensayos independientes con sus respectivas desviaciones estándar. pYES2::*HaLPCAT1* (-■-), plásmido pYES2 (-●-).

Para determinar la cantidad óptima de proteína microsomal necesaria para el ensayo con *HaLPCAT1* se llevaron a cabo reacciones dentro de un intervalo de entre 0.2 y 3 µg de proteína microsomal durante 4 min y para determinar el tiempo de reacción óptimo se llevaron a cabo reacciones con 1 µg de proteína microsomal durante tiempos de incubación que variaron entre 2 y 30 min. Los resultados se muestran en la Figura 33. La actividad mostrada por esta enzima fue mucho más alta que la detectada para la levadura control, hallándose respuestas lineales en los intervalos ensayados en ambos experimentos, por lo que en los experimentos de caracterización subsiguientes se emplearon concentraciones de proteínas y tiempos entre los ensayados en esta prueba preliminar.

Para determinar la cantidad óptima de proteína microsomal para el ensayo con *HaLPCAT3* se llevaron a cabo reacciones con una cantidad de proteína microsomal comprendida entre 4 y 30 µg durante 30 min y para determinar el tiempo de reacción óptimo se llevaron a cabo

reacciones con 20 μg de proteína microsomal con un tiempo de incubación que varió entre 15 y 120 min. A la vez que se llevaron a cabo las reacciones para la determinación de las condiciones de ensayo óptimas para *HaLPCAT3*, se llevaron a cabo reacciones control en paralelo con el plásmido pYES2 vacío (Figura 34).

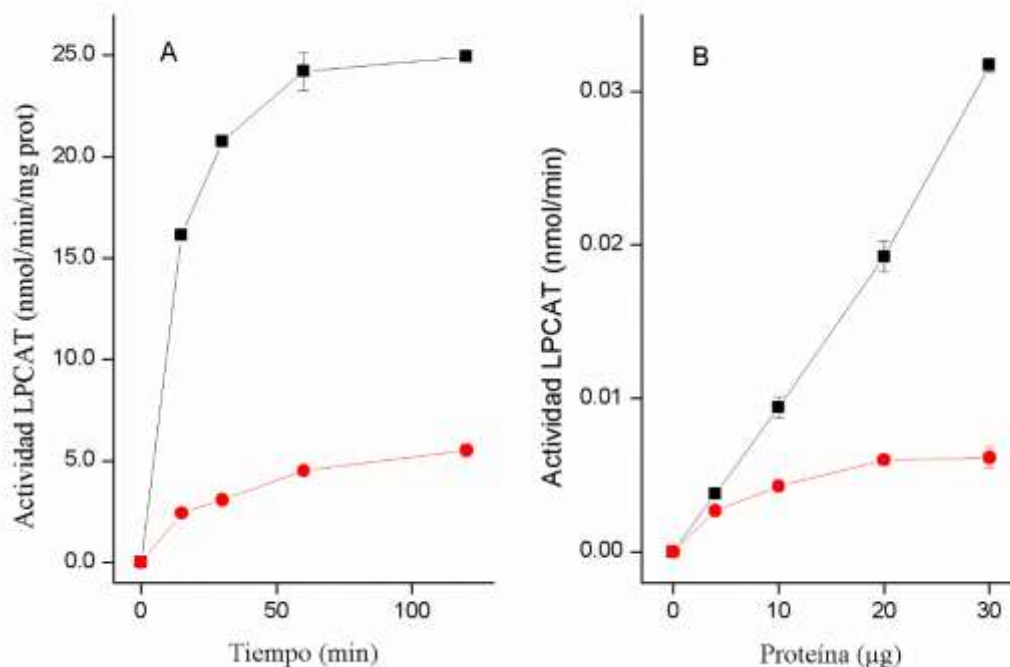


Figura 30. Estudios de la influencia del tiempo de reacción (A) y de la cantidad de proteína (B) en la actividad *HaLPCAT3* en la reacción directa, ensayada en microsomas de levadura. Actividad LPCAT expresada como la cantidad de PC formada menos la cantidad obtenida en reacciones a tiempo cero, en nanomol por miligramo de proteína (A) o por minuto de reacción (B). Los datos representan el valor medio de tres ensayos independientes con sus respectivas desviaciones estándar. pYES2::*HaLPCAT3* (■), plásmido pYES2 (●).

En este caso se observó que el nivel de actividad fue mucho más bajo, siendo la respuesta también diferente. Así, la curva de tiempo mostró una rápida pérdida de linealidad a tiempos mayores a 20 min mientras que la curva de proteína sí mostró linealidad en el rango estudiado.

Una vez determinados el tiempo y la cantidad de proteína microsomal óptimos, se procedió a realizar el estudio de las especificidades de acilo de las enzimas LPCAT, midiendo por triplicado la incorporación de diferentes sustratos acil-CoA sobre el glicerolípido marcado *sn*-1-[1-¹⁴C]-18:1-LPC siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.2.2.4.7. Los resultados mostrados en la Figura 35 indican que las tres enzimas *HaLPCAT* analizadas presentaron un perfil similar, con mayor nivel de actividad con acil-CoAs insaturados (18:1-, 18:2- y 18:3-CoA) que con acil-CoAs saturados (16:0- y 18:0-CoA), encontrándose el nivel de actividad más alto con 18:3-CoA. En estudios previos sobre especificidades de acilo de otras LPCAT de plantas, los cuales se realizaron de manera análoga por expresión en levadura, se observó, al igual que con las enzimas de girasol, un menor nivel de actividad con acil-CoAs saturados (Zhang et al., 2015; Zheng et al., 2012; Arroyo-Caro et al., 2013; Lager et al., 2013), lo cual sugiere que estas enzimas pueden estar contribuyendo, en parte, a la distribución posicional de estos ácidos grasos en los glicerofosfolípidos de las membranas celulares, en los cuales hay una baja concurrencia de los mismos en la posición *sn*-2 (Arroyo-Caro et al., 2013; AOCS Lipid Library).

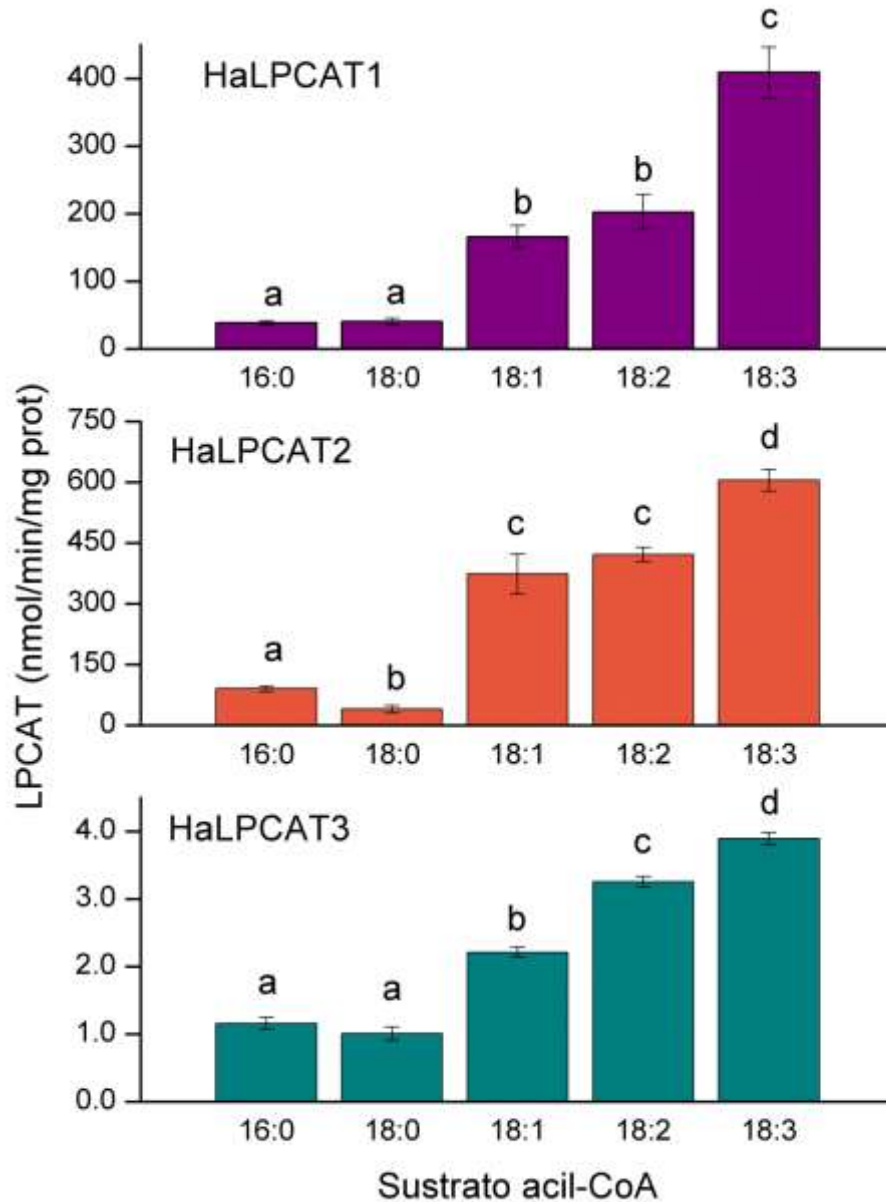


Figura 31. Actividad de las enzimas *HaLPCAT* en su reacción directa en función del sustrato acil-CoA. La actividad LPCAT se expresa como la cantidad de PC formada menos la cantidad de PC obtenida en reacciones a tiempo cero, en nanomol por minuto de reacción y por miligramo de proteína. Los datos representan el valor medio de tres ensayos independientes con sus respectivas desviaciones estándar y las letras representan agrupaciones estadísticas con nivel de significación del 0.05%. 16:0-CoA (palmitil-CoA); 18:0-CoA (estearil-CoA); 18:1-CoA (oleil-CoA, 18:1^{Δ9c}); 18:2-CoA (linoleil-CoA, 18:2^{Δ9c,12c}-CoA) y 18:3-CoA (α -linolenil-CoA, 18:3^{Δ9c,12c,15c}-CoA).

Más allá de esta preferencia por ácidos grasos insaturados frente a los saturados, las enzimas LPCAT de plantas presentan una gran variabilidad en cuanto a la especificidad por los sustratos acil-CoA. Así, por ejemplo, mientras que plantas como *Arabidopsis thaliana*, *Ricinus communis*, *Hiptage benghalensis*, y *Carthamus tinctorius* muestran especificidades similares para los acil-CoA insaturados 18:1-, 18:2- y 18:3-CoA, *Lesquerella fendleri* utiliza preferentemente 18:2-CoA (Lager et al., 2013; Arroyo-Caro et al., 2013) y en *Nicotiana*

benthamiana, al igual que en girasol, el acil-CoA que dio lugar a una mayor actividad fue 18:3-CoA (Zhang et al., 2015). Incluso en enzimas LPCAT de la misma planta, se han encontrado distintas especificidades de acilo, como en *Brassica napus*, donde *BnLPCAT1-1* exhibe preferencia por 18:2-CoA frente a 18:3- y 18:1-CoA y *BnLPCAT2* lo hace por 18:1- y 18:3-CoA (Zheng et al., 2012).

Además de la reacción directa, se ha demostrado que la enzima LPCAT es capaz de catalizar la reacción inversa, dando lugar a LPC y acil-CoA (Figura 12). La reacción en sentido inverso es termodinámicamente menos favorable que la reacción directa y, por tanto, el equilibrio de la reacción LPCAT favorece la formación de PC. Estudios *in vitro* demostraron que la adición de BSA o de una proteína de unión a acil-CoA (ACBP) favorece la reacción inversa probablemente porque al unirse al acil-CoA reducen la concentración de acil-CoA libre necesario para la reacción directa (Stymne y Stobart, 1984; Yurchenko et al., 2009). Esta reacción fue demostrada por primera vez mediante un estudio *in vitro* con microsomas de semillas de cártamo en el cual se observó cómo, en presencia de CoA y BSA, los grupos acilos marcados radiactivamente que se encontraban en posición *sn-2* de PC se transfirieron al conjunto de acil-CoAs (Stymne y Stobart, 1984). Una vez identificados y clonados los genes *LPCATs* de distintas plantas se demostró en ensayos *in vitro* que efectivamente estas enzimas podían operar en su reacción inversa (Lager et al., 2013). Estos investigadores observaron que la enzima LPCAT de *Arabidopsis* tenía una alta selectividad para eliminar grupos ricinoleil de PC, lo cual estaba en línea con los estudios realizados *in vivo* por Bates y Browse (2011) en semillas de *Arabidopsis* transformada con la hidroxilasa de ricino en los que detectaron que un 50% del conjunto de DAG recién sintetizado tenía un grupo ricinoleil mientras solo un 2% del conjunto de PC poseía este grupo acilo. Es decir, el estudio de selectividad de Lager et al. (2013) hace pensar que lo que observaron Bates y Browse (2011) fuese el resultado de la alta selectividad de la enzima *AtLPCAT* para transferir este grupo acilo desde PC hacia el conjunto de acil-CoA en su reacción inversa. Más tarde los resultados obtenidos en otro estudio *in vivo* apuntaron a que la enzima *LPCAT1* de lino también tenía la capacidad para catalizar la reacción en el sentido inverso (Pan et al., 2015).

En base a estos estudios, se procedió a determinar la especificidad de acilo en la reacción inversa, midiendo la desacilación de la posición *sn-2* de *sn-1-18:1-sn-2-¹⁴C-18:1-PC*, *sn-1-18:1-sn-2-¹⁴C-18:2-PC* y *sn-1-18:1-sn-2-¹⁴C-18:3-PC*, en presencia de BSA y CoA libre (3.2.2.4.7.). Las tres enzimas transfirieron el grupo acilo 18:1 de PC a acil-CoA a una velocidad inferior a la que lo hacían con 18:2 y 18:3 (Figura 36). Dado que los grupos acilo están unidos a una molécula soluble en la reacción directa y a un lípido de membrana en la reacción inversa, la presentación del grupo acilo a la enzima será muy diferente en las dos reacciones y no es por tanto sorprendente que la selectividad de acilo sea diferente entre las reacciones directa e inversa (Jasieniecka-Gazarkiewicz et al., 2016); así por ejemplo, las enzimas LPCAT de *Ricinus communis*, *Hiptage benghalensis*, *Lesquerella fendleri*, *Carthamus tinctorius* y *Arabidopsis thaliana* eliminan preferentemente el grupo ricinoleil que el oleil de PC en la reacción inversa, mientras que en la reacción directa el grupo ricinoleil es un donante de acilo peor (Lager et al., 2013). Estos resultados son compatibles con una canalización preferente del linoleato a lípidos de reserva en la semilla de girasol. Este ácido graso sería eliminado de la fracción de PC por la reacción inversa de las enzimas LPCAT de girasol pasando al conjunto de acil-CoA, donde estaría a disposición de las aciltransferasas de la ruta de Kennedy para su incorporación a TAG. Esta hipótesis está en buena concordancia con los resultados de Aznar-Moreno et al. (2013), que indicaban un rápido flujo y recambio de 18:2 en semillas en desarrollo.

Estos estudios también mostraron que los niveles absolutos de actividad de estas enzimas cuando son expresadas en levadura pueden estar sometidos a una gran variación, tal y como se ha observado para *HaLPCAT1* y *HaLPCAT2* frente a *HaLPCAT3* en la reacción directa. Curiosamente, esta variación en los niveles de actividad no se observó en la reacción inversa, lo

que puede indicar que dichas diferencias son quizás inherentes a las enzimas y no están relacionadas con sus niveles de expresión en la levadura.

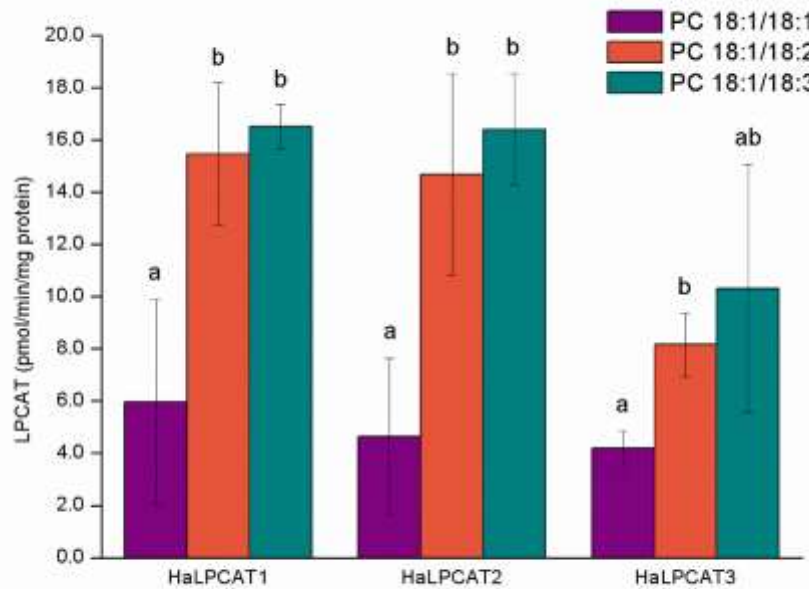


Figura 32. Actividad de las enzimas *HaLPCAT* en su reacción inversa en función del sustrato PC. La actividad LPCAT fue expresada como cantidad de acil-CoA formado menos la cantidad de acil-CoA obtenida en reacciones a tiempo cero, en picomol por miligramo de proteína y por minuto de reacción. Los datos representan el valor medio de tres ensayos independientes con sus respectivas desviaciones estándar y las letras representan agrupaciones estadísticas con nivel de significación del 0.05%. PC18:1/18:1 (*sn*-1-18:1-*sn*-2-[¹⁴C]-18:1-PC); PC18:1/18:2 (*sn*-1-18:1-*sn*-2-[¹⁴C]-18:2-PC) y PC18:1/18:3 (*sn*-1-18:1-*sn*-2-[¹⁴C]-18:3-PC).

Hay que tener en cuenta que las condiciones del ensayo *in vitro* podrían modificar los resultados y estas deben de tenerse en consideración para comparar los estudios de especificidad (Snyder et al., 2009). Así, por ejemplo, la enzima LPCAT de cultivos de suspensión de células derivadas de microesporas de *Brassica napus* utilizaba 18:1-, 18:0- y 16:0-CoA por igual a concentraciones de alrededor de 20 μ M, pero presentaba preferencia por 18:1-CoA en concentraciones más altas (Snyder et al., 2009; Furukawa-Stoffer et al., 2003). Por otro lado, las afinidades de las proteínas de unión a acil-CoA podrían influir indirectamente en las especificidades de sustrato de la reacción *in vivo*, ya que la afinidad por un acil-CoA en concreto haría variar la disponibilidad del mismo para la reacción (Snyder et al., 2009).

Los resultados obtenidos en este apartado demuestran que las tres enzimas codificadas por los genes *HaLPCAT* poseen actividad LPCAT catalizando tanto reacciones directas como inversas, lo cual sugiere que estas enzimas tienen un papel importante en la mediación del flujo de los grupos acilos, al facilitar el intercambio de acilo entre el conjunto de PC y el conjunto de acil-CoA. La especificidad de estas enzimas y su concurrencia conjunta con las desaturasas de retículo podrían determinar en cierta manera la composición final de aceite de girasol, al favorecer el flujo e intercambio de ácido linoleico entre el conjunto activo de PC y del resto de especies de lípidos de la planta.

4.1.12. ESTUDIOS DE COMPLEMENTACIÓN DEL MUTANTE DE ARABIDOPSIS *Atlpcat1/Atlpcat2*

Una vez las enzimas LPCAT de girasol se caracterizaron bioquímicamente *in vitro*, el último paso de esta parte de la presente tesis fue comprobar que estas enzimas eran activas en plantas. Las plantas son sistemas más complejos que las levaduras en términos de diferenciación, regulación y compartimentación. A este respecto, se prestó especial atención al papel que las enzimas *HaLPCAT* puedan tener en la síntesis de los lípidos de la semilla. Para estudiar el impacto de la expresión de estas enzimas en plantas se decidió expresarlas en el mutante *knockout* de Arabidopsis *Atlpcat1/Atlpcat2* descrito previamente por Bates et al. (2012). Este mutante tenía inserciones de T-ADN en los dos genes codificantes de las enzimas LPCAT de esta especie, las cuales impedían la expresión de los mismos. Aunque se suponía que este mutante no tenía ninguna expresión de enzimas LPCAT, estudios de PCR realizados en este trabajo mostraron una cierta expresión residual de los mismos, por lo que esta planta sería en realidad un *knockdown* y no un *knockout* (Figura 37). En cualquier caso, las inserciones sobre los genes *LPCAT* de Arabidopsis causaron un descenso de la acumulación de PUFA, sobre todo de 18:2 y 18:3, a expensas de un incremento de los ácidos grasos muy largos (VLCFA), especialmente 20:1 (Bates et al., 2012).

Los genes *HaLPCAT* se transfirieron al vector pBIN19::35S para su expresión en Arabidopsis. Este plásmido expresa los genes introducidos bajo el control del promotor constitutivo CamV35S, el cual provee de una elevada expresión de los genes en todos los tejidos. Una vez las plantas fueron transformadas, se propagaron durante 2 generaciones y se aislaron plantas homocigotas en los correspondientes transgenes, asegurando que la presencia de los mismos en las correspondientes progenies fuese homogénea y no se produjese segregación. Las semillas de estas plantas fueron caracterizadas, midiéndose su contenido y composición de aceite. Los datos se muestran en la Tabla 10. Así, puede verse que el mutante *Atlpcat1/Atlpcat2* presenta un fenotipo idéntico al descrito por Bates et al. (2012), conteniendo, tal y como se esperaba cantidades reducidas de 18:2 y 18:3 a costa de incrementos en 20:1, con respecto a la planta control Col-0. Este efecto es debido a una reducción en el flujo general de los PUFA dentro de los distintos compartimentos celulares de la planta. Esto conllevó al mismo tiempo un aumento de los ácidos grasos monoinsaturados largos, como el 20:1, ya que sus precursores son probablemente mejores sustratos para las elongasas del retículo que los correspondientes poliinsaturados.

Las mutaciones sobre los genes *LPCAT* no afectaron a la cantidad total de aceite almacenada en las semillas. La expresión de los tres genes *HaLPCAT* estudiados en este trabajo fue capaz de revertir los efectos de la doble mutación en todos los casos (Tabla 10). Así, la expresión de los tres genes implicó una recuperación del nivel de 18:2 y 18:3 de la planta silvestre, mostrando que estas enzimas funcionan eficazmente normalizando el flujo de dichos ácidos grasos, lo cual estuvo acorde con los datos obtenidos en la caracterización *in vitro*, donde fue con los sustratos poliinsaturados con los que se observó un mayor nivel de actividad (Figura 35). Estos resultados fueron análogos a los publicados por Bates et al. (2012) en sus experimentos de complementación. Con respecto a los VLCFA, es interesante constatar que se produjo un descenso considerable en las plantas que expresaban los distintos genes *HaLPCAT*, hasta el punto de disminuir por debajo de los contenidos mostrados por la planta silvestre en el caso de *HaLPCAT1* y *HaLPCAT2*. Esto podría deberse a la elevada expresión de estas enzimas en los transformantes o a diferencias en los parámetros bioquímicos con respecto a las formas de Arabidopsis. Por otra parte, los mutantes transformados con las enzimas LPCATs de girasol mostraron un menor contenido en aceite que las dos líneas control, debido probablemente al estrés causado a las plantas por la sobreexpresión de las enzimas.

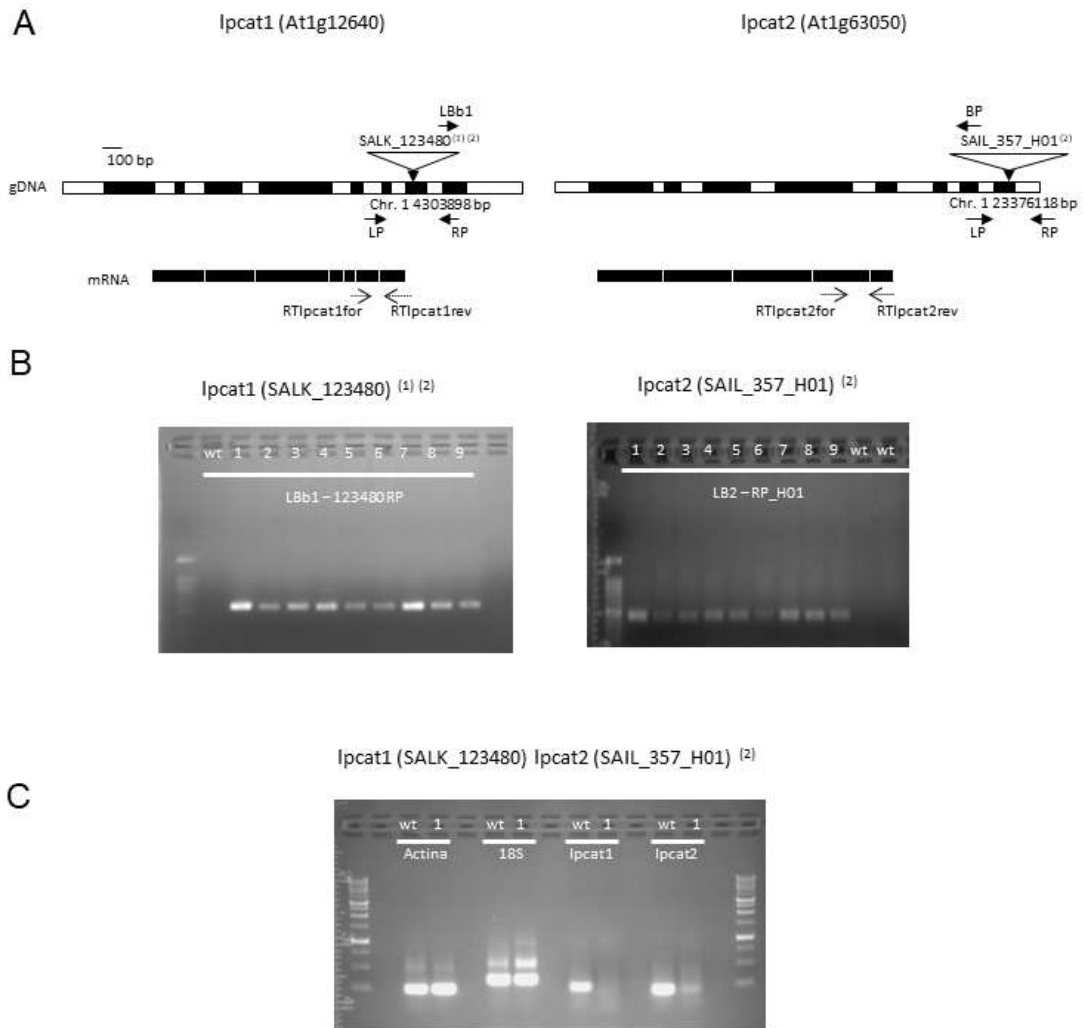


Figura 37. Caracterización previa del doble mutante insercional de *Arabidopsis* empleado en el presente estudio. (A) Diagramas esquemáticos de las posiciones precisas de las inserciones del T-ADN en el doble mutantes *lpcat* SALK_123480 (*lpcat1*) y SAIL 357_H01 (*lpcat2*). Los oligonucleótidos específicos LP y RP corresponden a los fragmentos que flanquean la inserción de T-ADN, en el lado izquierdo y derecho respectivamente. LbA1 y LbB1 son los oligonucleótidos que se unen al borde izquierdo del T-ADN de las líneas SALK y SAIL, respectivamente. (B) confirmación del inserto empleando PCR con los extremos del T-ADN en WT Columbia (control negativo) y 9 plantas progenie de *lpcat1* (SALK_123480) y (SALK_123480) *lpcat2* (SAIL_357_H01). (C) expresión génica en WT y el doble mutante de las correspondientes LPCAT que recibieron la inserción del T-ADN.

Tabla 10. Composición de ácidos grasos de semillas de *Arabidopsis thaliana* de la línea Col-0 (WT), del mutante *Atlpcat1/Atlpcat2* y del mismo mutante transformado con los genes *HaLPCATs*.

	Composición (mol %)															Aceite	
	16:0	16:1	18:0	18:1 ^{Δ9}	18:1 ^{Δ11}	18:2	18:3	20:0	20:1 ^{Δ11}	20:1 ^{Δ13}	20:2	20:3	22:0	22:1 ^{Δ13}	PUFAs	VLCFAs	%(p/p)
Col-0	7.1±0.4	0.26±0.03	3.6±0.1	15.2±0.2	1.50±0.03	27.6±0.4	16.7±0.3	2.22±0.08	19.7±0.5	1.7±0.1	1.84±0.06	0.44±0.02	0.36±0.36	1.9±0.13	46.5±0.6	28.2±0.9	24.5±0.4
<i>Atlpcat1/Atlpcat2</i>	6.3±0.4	0.26±0.5	3.2±0.1	18.4±1.1*	1.8±0.2	27.3±0.4	12.7±0.5*	1.49±0.06	22.7±0.7*	1.5±0.2	2.1±0.1*	0.34±0.04*	0.31±0.07	1.7±0.2	42.4*±0.6	30.1±1.0	24.0±5.9
<i>Atlpcat1/Atlpcat2</i> <i>HaLPCAT1</i>	7.8±0.4	0.47±0.04	3.2±0.1	16.1±1.0 [#]	2.1±0.1	29.5±0.5	16.6±0.9 [#]	1.28±0.09	17.7±0.7 [#]	1.8±0.2	1.9±0.2	0.28±0.05	0.20±0.07	1.1±0.2	48.3±1.1 [#]	24.2±1.3**	16.0±0.6
<i>Atlpcat1/Atlpcat2</i> <i>HaLPCAT2</i>	7.9±0.3	0.46±0.03	3.4±0.2	15.8±0.8 [#]	2.1±0.2	29.1±0.6	17.2±0.9 [#]	1.36±0.08	17.6±0.9 [#]	1.8±0.1	1.9±0.1	0.3±0.1	0.28±0.04	1.0±0.1	48.5±1.1 [#]	24.2±1.4**	13.0±1.1
<i>Atlpcat1/Atlpcat2</i> <i>HaLPCAT3</i>	8.1±0.3	0.48±0.10	3.4±0.2	13.9±1.1 [#]	2.1±0.1	26.8±0.5	17.1±0.8 [#]	1.72±0.06	20.0±0.6** [#]	2.0±0.2	2.3±0.2	0.48±0.07	0.24±0.02	1.4±0.1	46.7±0.1 [#]	28.1±1.2	16.6±1.3

Los datos son la media de determinaciones llevadas a cabo con 50 semillas recolectadas de 10 plantas independientes (T3) procedentes de 3 a 5 líneas homocigotas ± desviación estándar. Los asteriscos indican diferencias significativas con la planta Col-0 y el símbolo # indica diferencias significativas respecto al doble mutante de acuerdo a un ANOVA unidireccional con análisis Tuckey *post hoc* y nivel de significación del 0.05%. Las semillas obtenidas en la generación T3 fueron además examinadas para confirmar la expresión de los transgenes. Los genes *HaLPCATs* se expresaron en el plásmido pBIN19::35S.

4.2. CLONACIÓN Y CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LA ENZIMA FOSFATIDILCOLINA:DIACILGLICEROL COLINAFOSFOTRANSFERASA DE GIRASOL

Dentro de este trabajo, una vez caracterizada la actividad LPCAT de girasol, implicada en el principal mecanismo de intercambio de acilos que relaciona a PC con el conjunto de acil-CoA, se procedió a estudiar la actividad PDCT de dicha especie, clonando uno de los genes que codifican dicha actividad. Esta enzima que cataliza el intercambio del grupo polar de PC, la fosfololina, con DAG, se había identificado como una enzima de gran importancia dentro de los mecanismos que posibilitan la acumulación de ácidos grasos poliinsaturados y ácidos grasos inusuales en plantas como *Arabidopsis* (Wickramarathna et al., 2015; Bates et al., 2012; Hu et al., 2012).

4.2.1. CLONACIÓN DE UN FRAGMENTO INTERNO DEL GEN *HaPDCT*

Para la llevar a cabo la clonación de *HaPDCT* se realizó, en un primer paso, una búsqueda de EST de *Helianthus annuus* en la base de datos del NCBI haciendo uso del algoritmo de búsqueda *tblastn*. Esta búsqueda se realizó en base a la secuencia de la proteína homóloga en *Arabidopsis thaliana*, *AtPDCT*, que está codificada por el gen *AtRODI* (At3g15820, número de acceso de GenBank: NM_112452) (Salanoubat et al., 2000) y cuya secuencia se encuentra disponible en la página la página web ARALIP (Beisson et al., 2013; *The Arabidopsis Acyl-Lipid Metabolism Website*: <http://aralip.plantbiology.msu.edu>).

Siguiendo dicha estrategia se identificaron de siete EST, de los cuales solo cuatro poseían cierta homología con la proteína PDCT de *Arabidopsis thaliana*, considerando homólogos aquellos EST que el programa BLAST 2.0 del NCBI evaluó con una puntuación igual o mayor a 200. Estos EST no codificaban para los extremos de la proteína por lo que no se pudo diseñar directamente un par de oligonucleótidos específicos que permitiesen amplificar toda la región codificante. Por ello, para clonar la secuencia completa del gen *HaPDCT* fue necesario llevar a cabo primero la clonación de un fragmento interno del gen, después, la clonación de los extremos 3' y 5' mediante reacciones de PCR RACE y, por último, una vez conocida la secuencia de los extremos, la clonación de la secuencia completa.

Para llevar a cabo la clonación del fragmento interno se diseñaron oligonucleótidos específicos, a partir de las secuencias de los EST que poseían mayor homología con la proteína de *Arabidopsis*. Los oligonucleótidos diseñados, *HaPDCTF* y *HaPDCTR* (Anexo 1), amplificaban un fragmento interno del gen de girasol de 825 pb.

La clonación se realizó mediante una PCR estándar usando los oligonucleótidos diseñados y ADNc obtenido de semillas de girasol de la línea silvestre CAS-6 de 25 DDF. El producto de PCR se sometió a electroforesis en gel de agarosa observándose una única banda del tamaño esperado, que se cortó del gel para su purificación. El producto de PCR purificado se ligó en el vector de clonación pSpark® II y con el producto de esta ligación se transformaron células competentes de *E. coli*. A continuación, se realizó un escrutinio mediante PCR de colonias con los oligonucleótidos M13F y M13R (Anexo 1) para confirmar la presencia de la construcción pSpark®II::*HaPDCT* y se aisló el ADN plasmídico de los transformantes que la poseían. Por último, se confirmó la presencia del inserto mediante digestión con las enzimas *Pst*I y *Nco*I y aquellos plásmidos que poseían el inserto se enviaron a secuenciar.

Se confirmó que el fragmento clonado pertenecía al gen *HaPDCT*, traduciendo la secuencia nucleotídica a aminoácidos y comprobando que en el resultado obtenido tras realizar una búsqueda en la base de datos del NCBI con el algoritmo *blastp* se obtenían proteínas PDCT.

4.2.2. CLONACIÓN DE LA SECUENCIA COMPLETA DEL GEN *HaPDCT*

Una vez conocida la secuencia del fragmento interno se pudieron diseñar oligonucleótidos específicos para la clonación de los extremos 3' y 5' mediante reacciones de PCR RACE 3' y 5'. Para obtener la secuencia completa del extremo 3' del gen *HaPDCT*, se hizo uso del oligonucleótido FA2Z y de los oligonucleótidos específicos, *HaPDCTF2* y *HaPDCTF3* y para obtener la secuencia completa del extremo 5' se usaron los oligonucleótidos comerciales UPM y NUP y los oligonucleótidos específicos, *HaPDCTR2* y *HaPDCTR3*. Las secuencias de los oligonucleótidos están detalladas en el Anexo 1.

Los productos amplificados mediante estas PCR fueron clonados en el plásmido pSpark®II, siguiendo los mismos pasos que se siguieron para la clonación del fragmento interno. Tras la secuenciación de los productos amplificados, se confirmó que estos pertenecían al gen de interés por el solapamiento existente con la secuencia del fragmento interno previamente secuenciado. El solapamiento existente entre las secuencias de los tres fragmentos clonados de *HaPDCT* (fragmento interno, extremo 3' y extremo 5') permitió el ensamblaje *in silico* de las mismas y la deducción del ORF del gen *HaPDCT*. Se comprobó que la deducción del ORF era la correcta realizando una búsqueda de proteínas homólogas en la base de datos del NCBI, con el algoritmo *blastp*.

Para llevar a cabo la clonación de la secuencia completa de la zona codificante del gen se procedió al diseño de oligonucleótidos específicos que hibridasen en los extremos de la misma, *HaPDCTF4* y *HaPDCTR4* (Anexo 1). Con estos nuevos oligonucleótidos se realizó una PCR con una enzima de alta especificidad y fidelidad, usando como molde de reacción ADNc de semillas de girasol de la línea silvestre CAS-6 de 25 DDF. Esta PCR dio lugar a un único producto del tamaño esperado, 840 pb. Tras la adenilación y purificación del fragmento amplificado, este se ligó en el vector de clonación pMBL-T. Con el producto de esta ligación se transformó *E. coli*, se realizó una PCR de colonias con los oligonucleótidos M13F y M13R (Anexo 1) y se aisló el ADN plasmídico de varios transformantes. Se confirmó la presencia del inserto en las construcciones mediante digestión con la enzima *KpnI* y aquellas que lo poseían se enviaron a secuenciar.

A partir de la secuencia aminoacídica resultante de la traducción del gen clonado se confirmó la identidad de la secuencia por comparación con secuencias conocidas de otras PDCT de plantas depositadas en la base de datos del NCBI, usando el algoritmo de búsqueda *blastp*. Las secuencias, tanto nucleotídica como aminoacídica, de *HaPDCT* se depositaron en la base de datos de GenBank con los números de acceso KY235265 y ARQ87993, respectivamente. Estas secuencias se muestran en el Anexo 3. El gen clonado está codificado como HanXRQChr02g0058561 (*HaPDCT1*) dentro del genoma de girasol disponible en <https://www.sunflowergenome.org>. Cabe destacar que existe otra forma de PDCT en girasol, codificada como HanXRQChr16g0500411, que no ha sido caracterizada en este trabajo (*HaPDCT2*). Ambos genes se encontraron en los cromosomas 2 y 16 del genoma del girasol, respectivamente.

Las estructuras génicas de las dos formas de *HaPDCT* fueron estudiadas, resultando estar conformadas por tres exones separados por dos intrones, como en el caso de las formas de *Arabidopsis* (Figura 38). Aunque los genes de girasol mantienen la misma estructura de exones/intrones, presentan divergencias en el tamaño de estos últimos y en el tamaño de las regiones no traducidas.

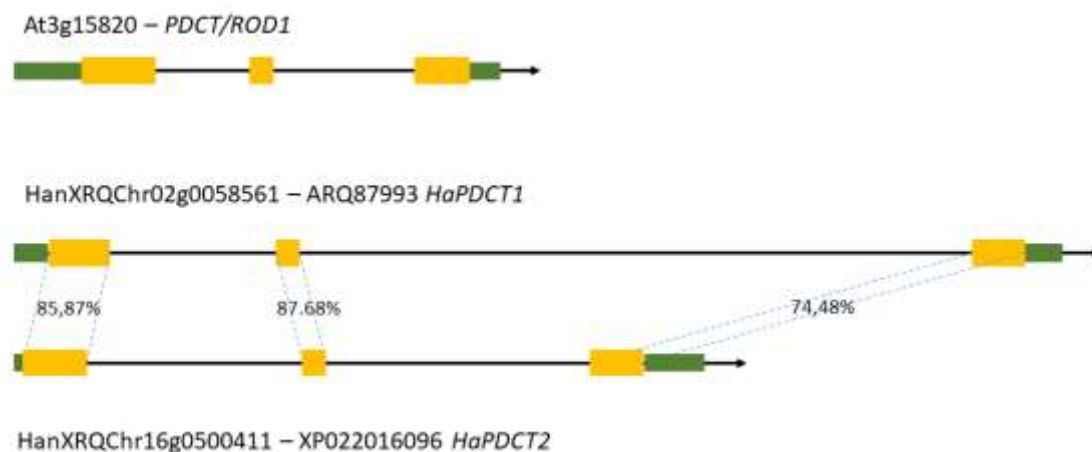


Figura 38. Esquema de las estructuras génicas de los genes codificantes de la enzima PDCT de *Arabidopsis thaliana* (*AtROD1*) y de girasol (*HaPDCT1* y *HaPDCT2*). Los porcentajes indican el grado de identidad de cada exón.

4.2.3. CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA AMINOACÍDICA DE LA PROTEÍNA *HaPDCT*

A partir de la secuencia nucleotídica del gen clonado se predijo un polipéptido de 279 aminoácidos, con un peso molecular de 30.64 kDa y un punto isoeléctrico estimado de 9.08. Este polipéptido presentó un porcentaje de residuos hidrofóbicos del 49.1% frente a un 36.2% de residuos hidrofílicos y un porcentaje de residuos básicos del 9.3% frente a un 5.4% de residuos ácidos. La proteína *HaPDCT* se clasificó dentro de la familia fosfatasa/fosfotransferasa de lípidos al encontrarse en su secuencia los dominios C2 (SGH) y C3 (SRXXXXXXHXXXD), característicos de esta familia (Sigal et al., 2005). En estos dominios se identificaron cinco residuos altamente conservados (Ser¹⁹⁵, Gly¹⁹⁶, His¹⁹⁷, His²³⁷ y Asp²⁴¹) y entre ellos la tríada catalítica (His¹⁹⁷, His²³⁷ y Asp²⁴¹) (Wickramarathna et al., 2015) (Figura 39).

Mediante el programa bioinformático *TopPred II* (von Heijne, 1992; Claros y von Heijne, 1994) y usando la escala de hidrofobicidad KD (Kyte y Doolittle, 1982), se estableció el perfil de hidrofobicidad de la proteína, encontrándose en su secuencia de seis dominios de transmembrana que estaban distribuidos a lo largo de toda la extensión de la cadena polipeptídica, sugiriendo que se trata de una proteína integral de membrana (Figura 40). Este resultado es consistente con lo observado en otras proteínas PDCT de plantas identificadas previamente, tales como *Arabidopsis thaliana*, *Ricinus communis* y *Linum usitatissimum* (Wickramarathna et al., 2015; Lu et al., 2009; Hu et al., 2012), y es una característica general de las proteínas de la familia LPT, a la cual pertenece esta enzima (Sigal et al., 2005).

```

HaPDCT 1 ---MGTITMNADKIHQRSIPQTTLLKT-----SNNVSINNFNLK----KTNNSTT---TWGS-- 48
SlPDCT 1 ---MNGDTFHRSRNSSSSTLSKRN-----TTERKVDVTEMK----KKSASATGTEVGGYGW 48
AtPDCT 1 ---MSAAAAETDVSLLRRRSNSLNGNHTNGVAIDGTLDDNNRRVGDNTNTHMDISAKKTONGYANGVGGGG-- 66
OsPDCT 1 MPPPPPPSLTANTASSMGNAEAVVLPAN-----GGARRRADKVHPAPMPDRAAGGAMEREAGGGVGG 63
PpPDCT 1 -----MDTSKKWSKGNKRISP----- 16

HaPDCT 48 ---LADASFLOMT-TSDVFGLFKYHPVPCFFAVSLLFFMGVEYTLRMIPSSPFFDILGFVATAYLHRVIV 114
SlPDCT 48 --WLGNAIFYMKNR-MEDVFGVVKYHPICIFAASLLFFMGVEYTLHMIPASAPFFDLGFIIVTVPLNRLLA 115
AtPDCT 66 --WRSKASFTTWT-ARDIVYVVRVYHWIPCMFAAGLLFFMGVEYTLQMIPARSEPFDLGFIIVTRSLNRVLA 133
OsPDCT 64 GGEVGGWRRPEWCSAAGVAGVLRRHFAAAAFGCGLLLFMAVEYTIIPMVPPAAPFVDLGFAAATRALHAGIA 133
PpPDCT 16 -----VFLRWR-PAEAWHIVRAHPWLMFLFINFALVIPLIYNISMIEPRGEEPYDAGEVITKRIHNILE 78

HaPDCT 115 ASPTLNTVLAGLNTVVFVGMQTTYIIGTWVIEGRPRATVAALFMFTCRG LGYSTQLPPEEGLFGSGADFF 184
SlPDCT 116 AKPALNTFLFAGLNTVVFVAMQAYILGTFLIEGRPRATISALFMFTFRG LGYATQLPPEEGLFGSGVDFP 185
AtPDCT 134 SSPDLNTVLAALNTVVFVGMQTTYIIVWTWLVEGRARATIAALFMFTCRG LGYSTQLPPEEGLFGSGVDFP 203
OsPDCT 134 ARPWLNSLLAALNTVVFVAMQAAAYILWAILGEGRPRAAVAAMMMFTCRGALGCATQLPPEEGLFGSGMDFP 203
PpPDCT 79 LRPTLNHVLAALANTALVVFQIVYIAWAWVVEGRFRFVPLASAFMFSSRG LGYSTQLPPEEGLFGSGVDFP 148

HaPDCT 185 VGNVSFFLFYSGHVAGSVIASLDMKRMHRELAFLEDTLNLQVVRLLSTRGHYTTIDLAVGVGAGMLFDS 254
SlPDCT 186 VGNVSFFLFYSGHVAASVIAASLDMKRMQRNEMARVFDALNVLQVVRLLSTRGHYTTIDLAVGIGAGILFDS 255
AtPDCT 204 VGNVSFFLFFSGHVAGSMIASLDMRRMQRRLRLAMVFDILNVLQSIIRLLGTRGHYTTIDLAVGVGAGILFDS 273
OsPDCT 204 VGNVSFFLFFSGHVAGAVIAAEDMRRRAGRRGMARLYDALNLQGVRLACRGHYTTIDLAVGVGAGLLFDM 273
PpPDCT 149 VGHVSFFLFFSGHVASIIATLTLRCVNRVRGALVMDLNLVLOTMRLLATRGHYTTIDVSGAFAGWACYH 218

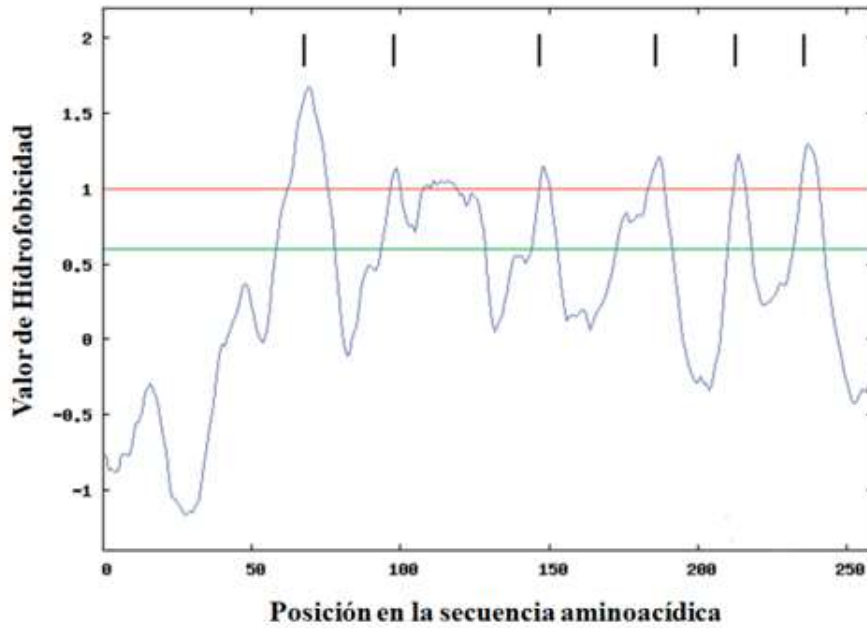
HaPDCT 255 IAGKYMKK----AMAEGGDVLYT-----NLPHLS---- 279
SlPDCT 256 MAGNYVETRTRKLSATNGIGVEYSPKHENGVKYQSVSSD 293
AtPDCT 274 IAGKYEEMMSKRHLGTGFSLSK----DSLNV----- 301
OsPDCT 274 IAGRYLDGKNTVDGGAAVAFGSR----CCSCHKALLSQ 307
PpPDCT 219 IAGLCEERIKTQSSSVAGVSDYI-----DLNL----- 245

```

Figura 39. Alineamiento de la secuencia aminoacídica de *HaPDCT* con proteínas homólogas de varias especies de Viridiplantae. Las plantas a las que pertenecen las secuencias y los números de acceso de GenBank son: *SlPDCT* (*Solanum lycopersicum*, XP_004235953), *AtPDCT* (*Arabidopsis thaliana*, NP_566527), *OsPDCT* (*Oryza sativa*, NP_001058029) y *PpPDCT* (*Physcomitrella patens*, XP_001763589). Los cinco residuos altamente conservados en las proteínas de la familia fosfatasa/fosfotransferasa de lípidos (LPT, *lipid phosphatase/phosphotransferase*) se encuentran encuadrados en rojo y los aminoácidos pertenecientes a la triada catalítica están indicados con una estrella. Con fondo negro aparecen los aminoácidos que son idénticos en todas las secuencias.

Comparando la secuencia aminoacídica de *HaPDCT* con las de otras proteínas cuyas localizaciones habían sido evidenciadas experimentalmente, el programa *DeepLoc* (Almagro-Armenteros et al., 2017) predijo que la proteína *HaPDCT* se localizaba en el retículo endoplásmico (Figura 41). Esto está en concordancia con el hecho de que esta enzima cataliza la reacción de intercambio del grupo fosfocolina entre PC y DAG participando así en la biosíntesis de TAG, que ocurre en las membranas de dicho orgánulo.

A



B

```

1  MGTITMNADKIHQRSIPQTTLLKTSNNVSIINNFNLKKTNNSTTTWGS LADASF LQWTT
61  DVFGFLFKYHPVPCFFAVSLLFFMGVEYTLRMIPPSSPFEDIGFVATAYLHRVLVASPTLN
121 TVLAGLNTVFVGMQTTYIIGTWIEGRPRATVAALFMFTCRGILGYSTQLPLPEGLGSG
181 ADFPVGIVSFFLFYSGHVAGSVIASFDMKRMHRNELAFLFDTLNLLOVVRL LSTRGHYTI
241 DLAVGVGAGMLFDSLAKYMKKAMAEGGDVLYTNLPHLS
  
```

Figura 40. Perfil de hidrofobicidad (A) y dominios de transmembrana (B) de *HaPDCT* determinados con el programa *TopPred II* (von Heijne, 1992; Claros y von Heijne, 1994). Las regiones de hidrofobicidad con valores superiores a 1 son dominios de transmembrana "probables" y las regiones con valores superiores a 0.6 son dominios de transmembrana "posibles". Las barras verticales sobre el perfil indican las posiciones de los dominios de transmembrana "probables". Sobre la secuencia aminoacídica de *HaPDCT* se muestran enmarcados en verde los 6 dominios de transmembrana y marcados en rojo se muestran los aminoácidos pertenecientes a la triada catalítica.

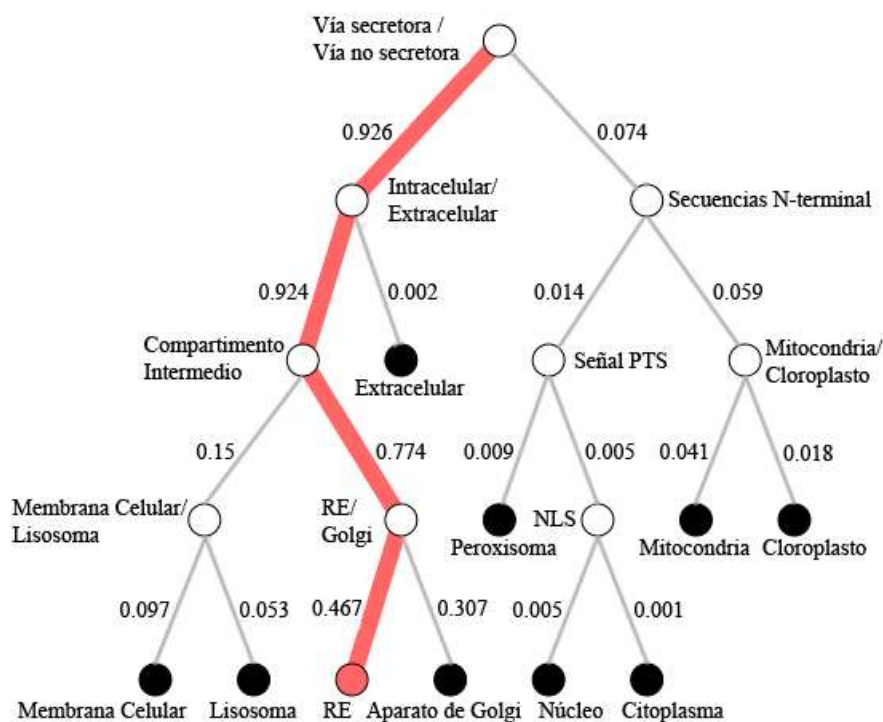


Figura 41. Algoritmo de predicción de la localización subcelular de la proteína *HaPDCT*. Los valores numéricos indican la probabilidad de localización de las proteínas en el medio extracelular, en la membrana celular, en el citoplasma o en distintos orgánulos celulares. En rojo se indica la localización subcelular más probable. Los resultados se obtuvieron con el programa *DeepLoc* (Almagro-Armenteros et al., 2017). RE: retículo endoplásmico, NLS: señal de localización nuclear, PTS: secuencia de señal al peroxisoma.

4.2.4. MECANISMO ENZIMÁTICO PROPUESTO PARA *HaPDCT*

La identificación de los dominios conservados en la secuencia de la proteína *HaPDCT* hace pensar que su mecanismo catalítico podría ser homólogo al de las proteínas SMS, pertenecientes también a la familia LPT, aunque se necesitarían más estudios para confirmar la importancia de estos dominios en PDCT (Lu et al., 2009).

Así, el mecanismo enzimático propuesto para PDCT procedería a través de la triada catalítica formada por la histidina y el ácido aspártico del dominio C3 (His-C3 y Asp-C3) y la histidina del dominio C2 (His-C2) e implicaría un único sitio de unión a la molécula lipídica y la formación de un enlace colina-fosfohistidina (Tafesse et al., 2006; Huitema et al., 2004; Sigal et al., 2005). En un primer paso, una molécula de PC (PC-1) se uniría a la enzima (Figura 42, panel 1). A continuación, su grupo fosfocolina se transferiría al residuo His-C3 mediante un ataque nucleofílico de His-C3, asistido por el residuo Asp-C3, formándose el intermediario colina-fosfohistidina (Figura 42, panel 2). Mientras el grupo fosfocolina sigue unido a la enzima, ocurriría la liberación de la molécula de DAG recién formada (DAG-1), facilitada por His-C2 que actuaría como base y, posteriormente, la molécula DAG1 quedaría remplazada por otra molécula de DAG (DAG-2) (Figura 42, panel 3). Mediante un ataque nucleofílico del grupo hidroxilo de DAG-2 sobre la colina-fosfohistidina, asistido por el residuo His-C2, el grupo fosfocolina se transferiría a la molécula de DAG-2 generándose una nueva molécula de PC (PC-2) (Figura 42, panel 4). En un último paso, PC-2 se liberaría del sitio activo para permitir otra ronda de catálisis (Figura 42, panel 5).

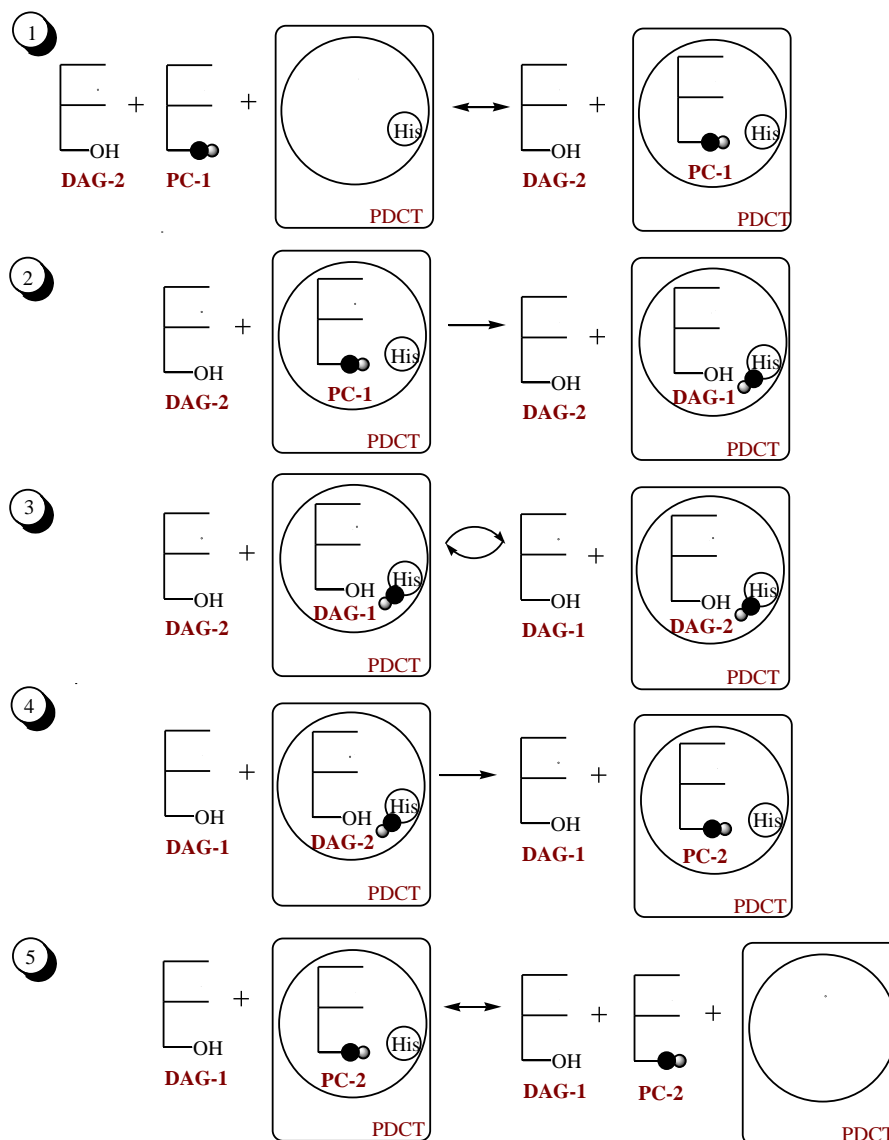


Figura 42. Representación esquemática del mecanismo enzimático propuesto para PDCT. His hace referencia a la histidina del dominio C3 de PDCT (His-C3).

4.2.5. ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE LAS PROTEÍNAS *Ha*PDCT

Conocidas las secuencias de las proteínas *Ha*PDCT se analizaron las relaciones evolutivas de las mismas con otras formas de PDCT, generando un árbol filogenético a partir de las mencionadas secuencias y de las de proteínas homólogas de otras plantas. Para enraizar el árbol se utilizó la proteína PDCT de *Physcomitrella patens* (*Bryophyta*).

La enzima PDCT no está distribuida de manera ubicua en todo el reino vegetal y, a pesar de que todo apunta a que está relacionada con la incorporación de ácidos grasos modificados en TAG, no se han encontrado homólogos de PDCT en ciertas especies de plantas que acumulan ácidos grasos conjugados, como el melón amargo (*Momordica charantia*) o el árbol de tung (*Vernicia fordii*) (Wickramarathna et al., 2015). Tampoco se han encontrado homólogos en ninguna especie de alga verde (*Chlorophyta*), a pesar de disponerse de las secuencias completas de algunos de sus genomas, indicando que este gen puede tener un origen relativamente reciente.

A pesar de que no existen homólogos en todas las plantas, se puede observar en el árbol filogenético (Figura 43) que las proteínas PDCT se distribuyen ampliamente en el reino vegetal, lo que es coherente con el hecho de que estas proteínas desempeñan un papel importante en el metabolismo de los fosfolípidos. Todas las proteínas PDCT de las plantas dicotiledóneas analizadas, entre ellas la de girasol, forman un clado grande lo que sugiere que en esta clase de plantas existe un origen filogenético común para estas proteínas. El análisis filogenético reveló que las proteínas *HaPDCT* están muy próximas entre sí y estrechamente relacionadas con las isoformas del tomate (*Solanum lycopersicum*) que, al igual que el girasol, pertenece a la subclase *Asteridae*. Las proteínas *HaPDCT* presentan un elevado porcentaje de identidad con estas proteínas, del 64-65%, mientras que con las de *Physcomitrella patens*, que fueron usadas para enraizar el árbol, comparten tan solo un 46-48% de identidad (Figura 43). En la mayoría de las especies vegetales analizadas, por ejemplo, en todas las pertenecientes a la familia de las *Brassicaceae*, se han identificado dos copias de este gen, que pudieron originarse de forma independiente por duplicación génica. No siguen este patrón plantas como en el ricino (*Ricinus communis*) o la vid (*Vitis vinifera*), donde solo se ha identificado una copia de *PDCT* en su genoma.

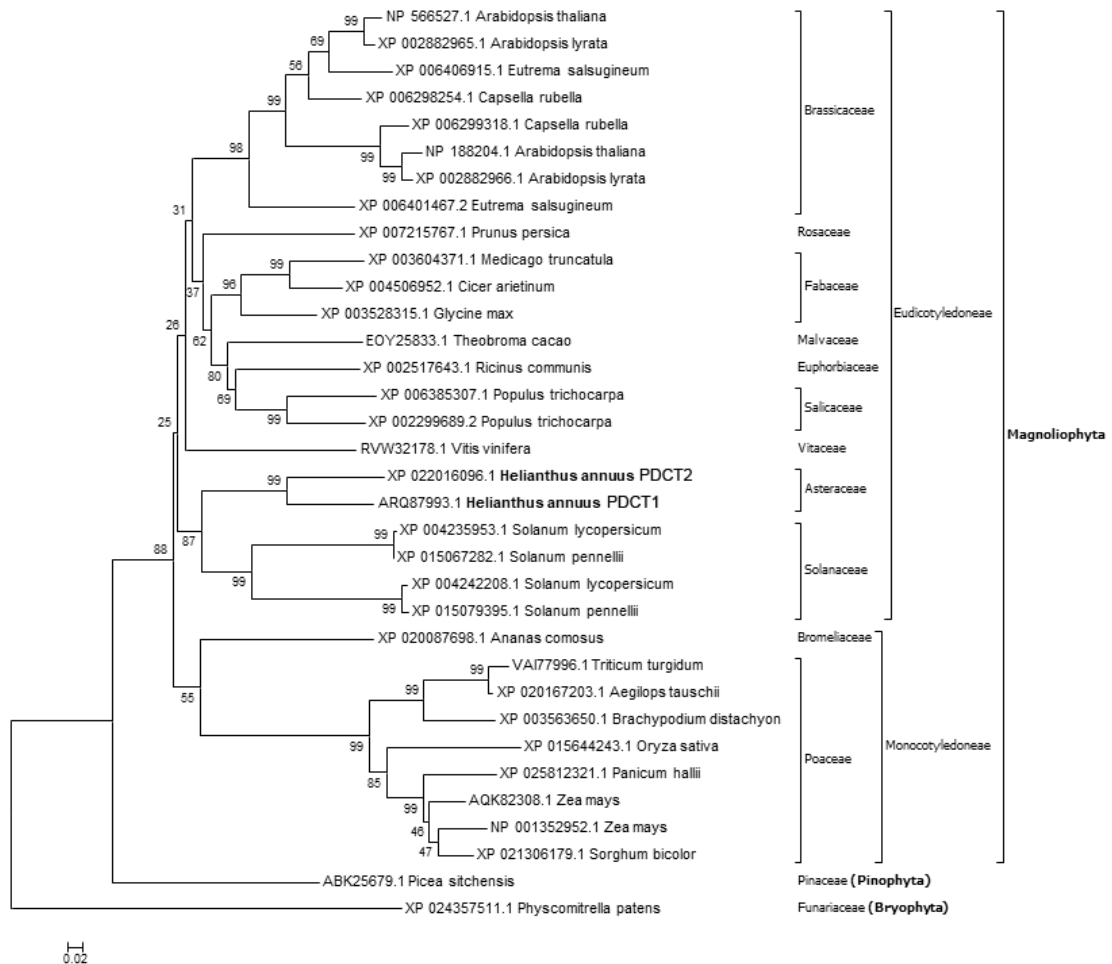


Figura 33. Árbol filogenético de las proteínas *HaPDCT* junto con proteínas homólogas de distintas especies vegetales. El árbol se realizó con el programa MEGA6 (Tamura et al., 2013) aplicando el método *Neighbor-Joining* y se enraizó con la proteína PDCT de *Physcomitrella patens* (Bryophyta). Se indican las referencias de GenBank para cada proteína y en negrita se resaltan las proteínas de girasol, *HaPDCT1* y *HaPDCT2*.

4.2.6. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA DE *HaPDCT* EN SEMILLAS Y TEJIDOS VEGETATIVOS

El siguiente paso en la caracterización de la proteína PDCT de girasol fue estudiar su perfil de expresión génica, analizando los niveles de expresión del gen *HaPDCT* en raíz, tallo, hoja, cotiledón y semillas de 12 a 28 DDF, de la línea silvestre de girasol CAS-6. Esto se realizó mediante PCR cuantitativa empleando la actina de girasol (*HaACT1*, FJ487620) como gen calibrador. Con el fin de obtener una mayor eficiencia en la amplificación, los oligonucleótidos se diseñaron de forma que amplificasen una región de entre 100 y 300 pb. Los dos pares de oligonucleótidos diseñados fueron q*HaPDCTF*/q*HaPDCTR*, que amplificaba un fragmento de 151 pb de *HaPDCT* y q*HaACTF*/q*HaACTR*, que amplificaba un fragmento de 96 pb del gen actina de girasol. Las secuencias de los oligonucleótidos se detallan en el Anexo 1.

Durante el diseño de estos oligonucleótidos, se comprobó la especificidad de los mismos realizando a partir de ellos una búsqueda de EST de *Helianthus annuus* en la base de datos del NCBI con el algoritmo *blastn*. Además, una vez diseñados, se realizó con ellos una PCR y el producto se visualizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% (p/v). En este gel se observó una única banda del tamaño esperado (151 pb), lo que corroboró la especificidad de estos oligonucleótidos. Las eficiencias de amplificación de los dos pares de oligonucleótidos diseñados, obtenidas tras realizar las rectas de calibrado, estaban comprendidas entre un 90 y un 110% y el coeficiente de regresión en ambos casos fue ≥ 0.985 , indicando que las condiciones de ensayo eran adecuadas en cuanto a reproducibilidad y sensibilidad. Además, se comprobó la ausencia de dímeros de oligonucleótidos y la especificidad de productos de PCR al obtener un único pico aislado en las curvas de desnaturalización obtenidas tras realizar las PCR cuantitativas (datos nos mostrados).

Como puede observarse en el panel A de la Figura 44, *HaPDCT* se expresó en todos los tejidos ensayados, aunque los niveles de expresión obtenidos en tejidos vegetativos fueron muy bajos en comparación con los obtenidos en semillas en desarrollo. En semillas, los niveles de expresión más bajos se obtuvieron durante las primeras etapas del desarrollo de las mismas y los más altos se alcanzaron durante la etapa media-tardía, con un máximo a los 20 DDF, momento en el cual la expresión disminuyó levemente. En el panel B de la Figura 44 se representa el perfil de expresión del gen homólogo de *Arabidopsis thaliana*, *AtROD1*, obtenido de la base de datos de expresión génica en *Arabidopsis thaliana* de la Universidad de Toronto (Schmid et al., 2005; <http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>). Este gen presentó un patrón de expresión semejante al obtenido para *HaPDCT*, expresándose mayoritariamente en semillas en desarrollo y alcanzando los niveles de expresión más altos durante la etapa media-tardía del desarrollo. El mismo patrón de expresión se observó para los dos genes homólogos de lino (*Linum usitatissimum*) (Wickramarathna et al., 2015). Sin embargo, tanto en *Arabidopsis* como en lino, la disminución de la expresión tras alcanzar el máximo fue más drástica que en girasol. Wickramarathna et al. sugieren que las dos proteínas PDCT de lino pueden estar desempeñando un papel activo en el aumento del contenido de ácidos grasos poliinsaturados del aceite de semilla ya que observaron un aumento de la expresión hasta alcanzar un máximo a los 11 DDF y una disminución drástica después de los 16 DDF, coincidiendo con el aumento del contenido de 18:3 que se tiene en las semillas de lino entre los 8 y los 16 DDF. En girasol, el contenido del ácido graso poliinsaturado con mayor presencia en su aceite, 18:2, aumenta entre los 15 y los 25 DDF (Aznar-Moreno et al., 2013), periodo en el que también aumenta la expresión de *HaPDCT*. Estos resultados apuntan por tanto a un papel activo de esta enzima en la síntesis del aceite de girasol.

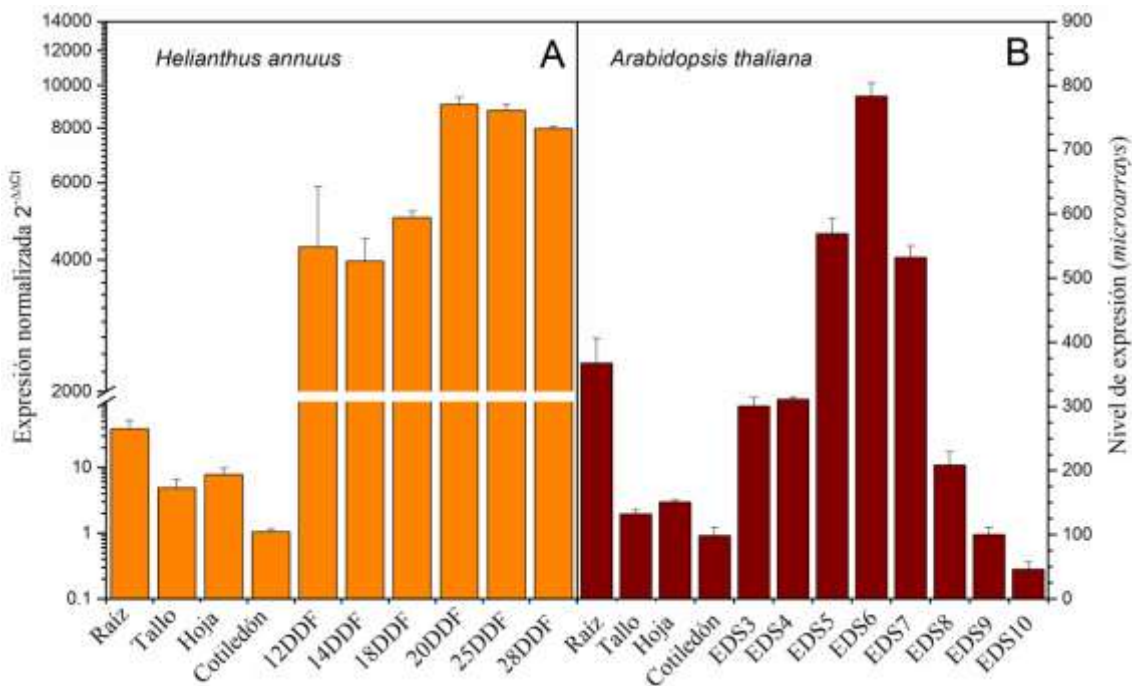


Figura 34. Perfil de expresión del gen *PDCT* de *Helianthus annuus* (A) y de *Arabidopsis thaliana* (B) en tejidos vegetativos y en semillas en desarrollo. Los datos de expresión de *HaPDCT* se obtuvieron mediante PCR cuantitativa, usando ADNc de girasol de la línea silvestre CAS-6 y el gen de la actina de girasol (*HaACT1*, FJ487620) como gen calibrador. Los datos representan los valores medios \pm desviación estándar de tres muestras biológicas independientes y dos replicados técnicos por cada replicado biológico. Los datos de expresión de *AtROD1* (NM_112452, At3g15820) se obtuvieron de la base de datos de expresión génica en *Arabidopsis thaliana* de la Universidad de Toronto (Schmid et al., 2005; <http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>). DDF: Días Después de Floración; EDS Estadio De la Semilla: 3: embriones en fase globular; 4: embriones en fase de temprano a fase tardía de corazón; 5: embriones en fase de corazón tardía a mediados de torpeda; 6: embriones de mediados a tarde fase de torpeda; 7: embriones de fase tardía de torpeda a temprana de bastón; 8: embriones en fase de bastón a cotiledón; 9: embriones de fase de cotiledón a semilla madura; 10: semilla madura.

4.2.7. SUBCLONACIÓN DE LA SECUENCIA COMPLETA DEL GEN *HaPDCT* EN VECTORES PARA SU EXPRESIÓN EN *S. cerevisiae*

Para realizar la clonación en el vector de expresión pYES2, se partió de la construcción realizada previamente en pMBL-T, cuyo inserto consistía en la región codificante completa del gen *HaPDCT*. El inserto se extrajo de la construcción mediante digestión con la enzima *KpnI*, cuya diana no se encontraba en la región codificante del gen pero sí a ambos lados de esta, permitiendo la liberación del inserto. El producto de la digestión se purificó mediante electroforesis en gel de agarosa y, a continuación, el inserto se ligó en el vector de expresión previamente digerido con la misma enzima de restricción, desfosforilado y purificado en gel de agarosa. El producto de esta ligación se usó para transformar *E. coli* y, tras la comprobación de los transformantes mediante PCR de colonias con los oligonucleótidos GAL1F y CYCR (Anexo 1), se aisló el ADN plasmídico de varios de ellos. Los plásmidos que poseían el inserto se enviaron a secuenciar y se confirmó la identidad de la secuencia clonada por comparación con la secuencia ya obtenida tras la clonación en el vector de clonación (Anexo 3).

Para realizar la clonación génica en el vector de expresión p423GPD se partió de la construcción pYES2::*HaPDCT*. En este caso, para liberar el inserto, se realizó una digestión con la enzima *EcoRI*, cuya diana no se encontraba en la región codificante del gen pero sí a ambos lados de esta. El producto de la digestión se purificó mediante gel de agarosa y, a continuación, el inserto se ligó en el vector p423GPD, previamente digerido con la misma enzima de restricción, desfosforilado y purificado en gel de agarosa. Con la construcción

obtenida, se siguieron los mismos pasos que los seguidos para la clonación en pYES2, explicados en el párrafo anterior.

4.2.8. EFECTO DE LA EXPRESIÓN DE *HaPDCT* SOBRE LA COMPOSICIÓN DE ÁCIDOS GRASOS EN LEVADURA

Las propiedades y, por tanto, los usos de los aceites vegetales, vienen determinados por la composición de ácidos grasos de los TAG. A este respecto, son de especial interés los ácidos grasos poliinsaturados y los ácidos grasos inusuales, como aquellos con ramificaciones o sustituyentes como grupos hidroxilo o epoxi (Dyer y Mullen, 2008; Dyer et al., 2008; Pinzi et al., 2009; Riediger et al., 2009; Bates et al., 2012).

Estudios en *Arabidopsis thaliana* han demostrado la importancia de la reacción de intercambio del grupo fosfolina entre PC y DAG, que cataliza PDCT, para proporcionar ácidos grasos poliinsaturados para la síntesis de TAG (Bates et al., 2012), ya que, junto con la edición de acilos, es una de las dos vías principales que controla la composición de acilos en PC, molécula en la cual tienen lugar las desaturaciones de los ácidos grasos. La expresión de *HaPDCT* en levadura no provoca cambios aparentes en su composición de ácidos grasos (datos preliminares no mostrados), por lo que se investigó su capacidad para incrementar la acumulación de ácidos grasos poliinsaturados en levaduras expresando la desaturasa de *Camelina sativa* (*CsFAD2*). Para estudiar el efecto de *HaPDCT* sobre los niveles de ácidos grasos poliinsaturados se llevó a cabo el análisis de la composición de ácidos grasos al coexpresarse heterológicamente en levadura junto con *CsFAD2*. Para ello, la línea de levadura Y02431 se transformó con la construcción p416GPD::*CsFAD2* y con el plásmido p423GPD vacío o con las construcciones p416GPD::*CsFAD2* y p423GPD::*HaPDCT*. Como control, se usó la levadura transformada con los plásmidos p416GPD y p423GPD vacíos. El análisis se realizó con 6 replicados biológicos.

Al igual que en el experimento realizado con las enzimas *HaLPCAT*, en la levadura transformada con la construcción p416GPD::*CsFAD2* se detectaron ácidos grasos poliinsaturados, 16:2^{Δ9c,12c} y 18:2^{Δ9c,12c}, que no se encontraron en la levadura transformada con los plásmidos vacíos, observándose también una disminución concomitante de sus precursores, 16:1^{Δ9c} y 18:1^{Δ9c} (Tabla 11). Cuando se coexpresó *HaPDCT* junto con *CsFAD2*, se observó una tendencia al aumento de acumulación de 18:2^{Δ9c,12c}, aunque dicho aumento no fue significativo respecto a las células que expresaban solo *CsFAD2* (Tabla 11). Este resultado no aporta pruebas concluyentes sobre el papel de la *HaPDCT* en la acumulación de ácidos grasos poliinsaturados.

Tabla 11. Composición de ácidos grasos de la cepa Y02431 de *Saccharomyces cerevisiae* que expresa *HaPDCT* en presencia o ausencia de expresión del gen oleato desaturasa de *Camelina sativa* (*CsFAD2*).

Composición de ácidos grasos (% mol)					
Construcciones	16:1 ^{Δ9c}	16:2 ^{Δ9c,12c}	18:0	18:1 ^{Δ9c}	18:2 ^{Δ9c,12c}
p416GPD p423GPD	25.5 ± 2.6	0.0 ± 0.0	8.9 ± 0.7	45.8 ± 5.0	0.0 ± 0.0
p416GPD:: <i>CsFAD2</i> p423GPD	20.3 ± 4.4	5.2 ± 2.6	15.3 ± 6.4	16.1 ± 3.2	23.1 ± 7.2
p416GPD:: <i>CsFAD2</i> p423GPD:: <i>HaPDCT</i>	19.5 ± 0.8	4.2 ± 1.0	11.9 ± 0.7	15.5 ± 3.5	27.6 ± 1.7

Los valores representan el valor medio y la desviación estándar de seis réplicas biológicas independientes. 16:1^{Δ9c} (ácido palmitoleico); 16:2^{Δ9c,12c} (ácido palmitolinoleico); 18:0 (ácido esteárico); 18:1^{Δ9c} (ácido oleico); 18:2^{Δ9c,12c} (ácido linoleico).

A este respecto, Wickramarathna et al. (2015) sí encontraron incremento en la síntesis de PUFA en levaduras expresando las proteínas PDCT de lino, aunque cabe destacar que el nivel de PUFA encontrado por dichos autores en las levaduras control transformadas solo con las desaturasas fue extremadamente bajo (menor del 1%) comparado con el nivel encontrado en este trabajo. Esta diferencia se debe posiblemente al sistema de expresión empleado en ambos trabajos, y puede estar ocurriendo que la elevada expresión de la desaturasa de *Camelina sativa* en nuestras células provoque una producción de PUFA demasiado alta, que quizás esté enmascarando el efecto de *HaPDCT*.

4.2.9. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE *HaPDCT*

A igual que para las enzimas *HaLPCAT*, para el estudio *in vitro* de la enzima *HaPDCT* se usaron fracciones microsomales de levadura que expresaban heterológicamente dicha proteína. Se eligió este método y no la caracterización de la enzima purificada porque, al igual que para las enzimas anteriores, la presencia de varios dominios de transmembrana en su secuencia la hace una enzima integral de membrana que se desnaturaliza durante el proceso de solubilización perdiendo totalmente su actividad, como así se comprobó en experimentos preliminares. Así mismo, esta actividad había sido medida y caracterizada previamente en otras fuentes en preparaciones similares (Lu et al., 2009; Hu et al., 2012; Wickramarathna et al., 2015).

El primer objetivo establecido, previo al estudio de especificidad, fue determinar la cantidad de proteína microsomal y el tiempo de reacción óptimos. Para ello, se llevaron a cabo, por triplicado, reacciones con preparaciones de membrana de la levadura HJ091 transformada con la construcción *p423GPD::HaPDCT* y con el vector vacío como control, usando como sustratos de la reacción *sn*-1-18:1-*sn*-2-[¹⁴C]-18:1-PC (11 μ Ci/ μ mol) y *sn*-1,2-18:1-DAG (Sigma-Aldrich, EE. UU.) y realizando el ensayo como se describe en Materiales y Métodos (3.2.2.7.2.).

Para determinar la cantidad óptima de proteína microsomal se llevaron a cabo reacciones durante 1 h con 50, 100, 150 y 200 μ g de proteína microsomal y se midió la cantidad de DAG radiactivo formado por unidad de tiempo. Como se observa en la Figura 45A, las cantidades que se obtuvieron de DAG marcado radiactivamente en las reacciones llevadas a cabo con los microsomas de levadura que contenían el plásmido vacío fueron siempre inferiores a las cantidades obtenidas en las reacciones con los microsomas de levadura que contenían la enzima recombinante, lo que demostraba que el gen clonado codificaba una proteína con actividad PDCT. El intervalo lineal de velocidad de producción de DAG marcado radiactivamente por la acción catalítica de *HaPDCT* comprendió hasta los 150 μ g de proteína microsomal. Para determinar el tiempo de reacción óptimo, se llevaron a cabo reacciones con 80 μ g de proteína microsomal durante 30, 60 y 120 min. Se observó que el intervalo de respuesta lineal de la enzima abarcó hasta los 60 min de reacción (Figura 45B). Sobre esta base se realizó la caracterización de la especificidad de sustrato de esta enzima.

Un aspecto interesante de los ensayos de PDCT fue que también se detectó incorporación del sustrato marcado en TAG (Figura 46). La cantidad de TAG formado no incrementó al aumentar la cantidad de proteína microsomal (panel A) o el tiempo de reacción (panel B). Por lo demás, las cantidades de TAG obtenidas fueron prácticamente las mismas en las reacciones control con el vector vacío que en las reacciones en las que se expresaba *HaPDCT*. Es por tanto probable, que los TAG formados resultasen de la acción catalítica de enzimas endógenas, diferentes a PDCT, implicadas en la biosíntesis de TAG en levadura, que estuviesen presentes en la fracción microsomal, como por ejemplo PDAT (Dahlqvist et al., 2000). Este resultado también se observó en la caracterización enzimática de las proteínas homólogas de lino (Wickramarathna et al., 2015).

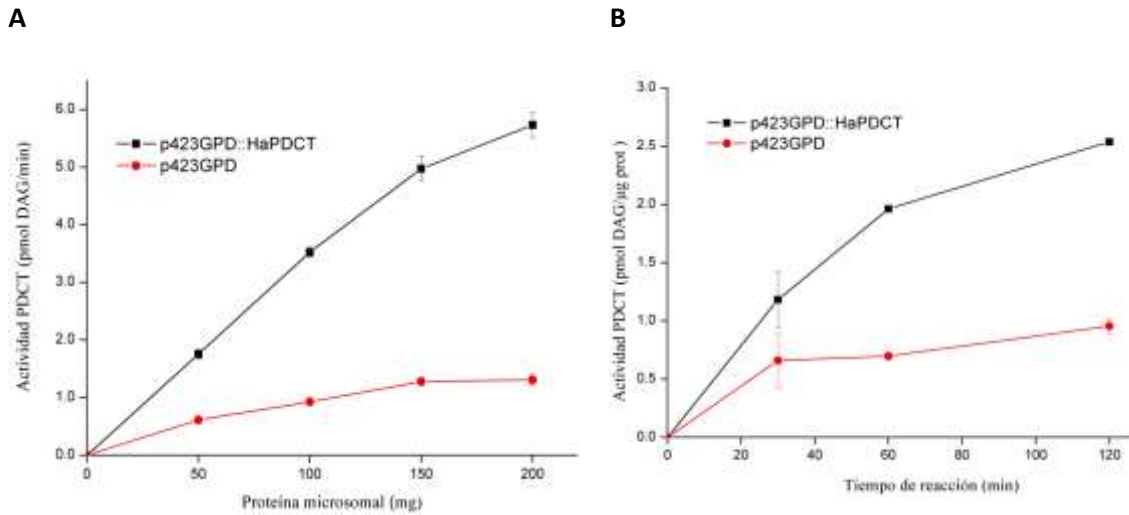


Figura 35. Actividad de *HaPDCT* en función de la cantidad de proteína microsomal (A) y del tiempo de reacción (B). El ensayo se llevó a cabo a partir de la fracción de microsomas obtenida a partir de células de levadura HJ091 que expresan heterológicamente *HaPDCT* o de células control transformadas con el vector *p423GPD* vacío. La actividad se expresa como cantidad de DAG radiactivo formado, en picomoles, por minuto de reacción. Las reacciones se llevaron a cabo a 30 °C durante 1 h en el caso de la curva de cantidad de proteína microsomal, y con 80 μg de proteína microsomal en el caso de la curva de tiempo. Los sustratos *sn*-1-18:1-*sn*-2-[¹⁴C]-18:1-PC (12.5 nmoles) y *sn*-1,2-18:1-DAG (100 nmoles). Los datos representan el valor medio y la desviación estándar de tres ensayos independientes.

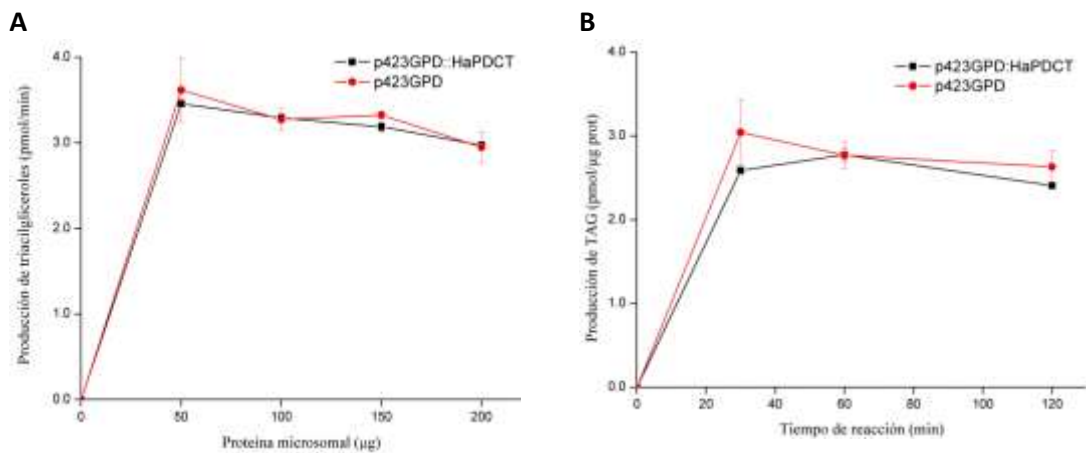


Figura 36. Producción de TAG en función de la cantidad de proteína microsomal (A) y tiempo de reacción (B) durante el ensayo de la enzima *HaPDCT*. El ensayo se llevó a cabo a partir de fracción de microsomas obtenidos a partir de células de levadura HJ091 que expresando heterológicamente *HaPDCT* o de células control transformadas con el vector *p423GPD* vacío. La actividad se expresa como cantidad de DAG radiactivo formado, en picomoles, por minuto de reacción. Las reacciones se llevaron a cabo a 30°C durante 1 h en el caso de la curva de proteína, y con 80 μg de proteína microsomal en el caso de la curva de tiempo. Los sustratos *sn*-1-18:1-*sn*-2-[¹⁴C]-18:1-PC (12.5 nmoles) y *sn*-1,2-18:1-DAG (100 nmoles). Los datos representan el valor medio y la desviación estándar de tres ensayos independientes.

4.2.10. ESTUDIO DE LA ESPECIFICIDAD DE SUSTRATO DE *Ha*PDCT

Con las condiciones de ensayo optimizadas, se procedió a estudiar la especificidad de la enzima por diferentes sustratos. Este estudio se realizó midiendo la actividad de la enzima PDCT con diferentes pares de sustratos. Las especies de PC empleadas fueron *sn*-1-18:1-*sn*-2- ^{14}C -18:1-PC (PC18:1/18:1) y *sn*-1-18:1-*sn*-2- ^{14}C -18:2-PC (PC18:1/18:2), mientras que las de DAG fueron la *sn*-1,2-dioleína (*sn*-1,2-18:1-DAG; DO) y la *sn*-1,2-dilinoleína (*sn*-1,2-18:2-DAG; DL), con el objetivo de estudiar la influencia del grado de desaturación de los acilos sobre esta actividad.

Los resultados mostraron que *Ha*PDCT presentaba un perfil amplio de especificidad, hallándose las actividades más altas con los pares de sustratos PC18:1/18:1 y DO y PC18:1/18:2 y DL (Figura 47). La aparente inespecificidad de la enzima no aporta información clara acerca del rol de la misma dentro del proceso de síntesis de lípidos. Así, las actividades medidas se mostraron altas con sustratos que no favorecen claramente un flujo de linoleato desde el conjunto de PC, donde se sintetiza, al de DAG y TAG. Este resultado, por otra parte, es coherente con el escaso impacto de la expresión de esta enzima en levaduras expresando la desaturasa *CsFAD2*, no dando lugar a un aumento significativo de la acumulación de linoleato inducido por *Ha*PDCT. Así, estos resultados parecen señalar que el papel de esta enzima en la síntesis de TAG en girasol es secundario, actuando más como elemento un elemento dinamizador del intercambio de acilos entre los conjuntos de DAG y PC sin un impacto claro en la composición final del aceite.

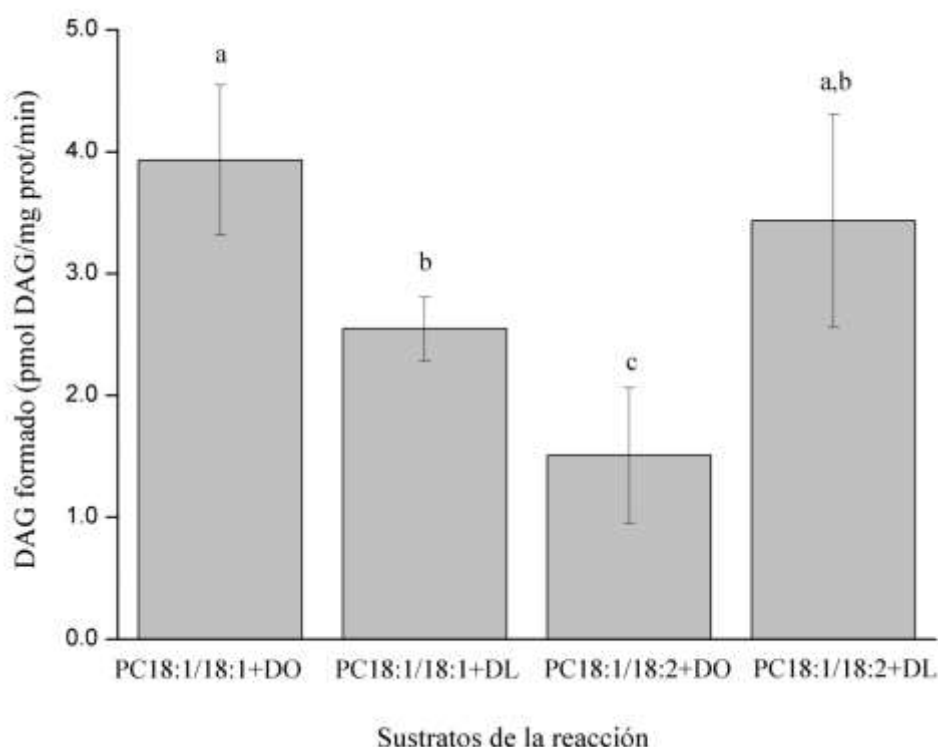


Figura 37. Especificidad por sustrato de *Ha*PDCT. Actividad PDCT con distintos sustratos medida tras expresar heterológicamente *Ha*PDCT en la estirpe de levadura HJ091. La actividad se expresa como cantidad de DAG radiactivo formado menos la cantidad de DAG radiactivo formado en las reacciones a tiempo cero, en picomol por miligramo de proteína microsomal y por minuto de reacción. Los datos representan el valor medio y la desviación estándar de tres ensayos independientes. Las letras corresponden con agrupaciones estadísticas con nivel de significación del 0.05%. Sustratos de la reacción: PC18:1/18:1 (*sn*-1-18:1-*sn*-2- ^{14}C -18:1-PC), PC18:1/18:2 (*sn*-1-18:1-*sn*-2- ^{14}C -18:2-PC), DO (*sn*-1,2-18:1-DAG) y DL (*sn*-1,2-18:2-DAG).

V. CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES

1. En el presente trabajo se clonaron las secuencias completas de los tres genes *LPCAT* presentes en el genoma del girasol, mostrando un alto nivel de homología. Estos genes codifican proteínas que se clasificaron como proteínas integrales de membrana con una predicción de localización en el retículo endoplásmico. Estas formas estuvieron relacionadas evolutivamente con las de tomate, que comparte subclase (*Asteridae*) con el girasol.
2. Los tres genes *LPCAT* de girasol presentaron perfiles de expresión génica diferentes. Mientras que *HaLPCAT1* se expresó principalmente en tejidos vegetativos, *HaLPCAT2* lo hizo en semillas en desarrollo dentro del periodo de acumulación de TAG y *HaLPCAT3* fue específica de semillas en desarrollo, mostrando un nivel de expresión bastante inferior al de los otros dos genes. Así pues, en base a estos datos las tres formas estudiadas podían tener implicación en la síntesis de TAG durante el periodo de acumulación de aceite en las semillas.
3. Los genes *LPCAT* de girasol fueron expresados en *Saccharomyces cerevisiae*, demostrándose, mediante ensayos de complementación, que codificaban enzimas funcionales. Así, fueron capaces de complementar, en presencia de liso-PAF, al mutante de levadura Y02431, deficiente en la actividad *LPCAT*. También se demostró que las enzimas *HaLPCAT* poseían actividad *LPAAT* al ser capaces de complementar al mutante *FBY4137* empleándose el sistema *URA3/5-FOA*.
4. La expresión de *HaLPCAT2* en levadura alteró la composición de especies de lípidos polares de los cultivos que la expresaron, alterando la proporción entre PI y PC, de manera que se incrementó la primera a expensas de la segunda. La coexpresión de *CsFAD2* dio lugar a una alteración de la proporción de dichos fosfolípidos en el sentido opuesto, incrementándose PC a expensas de PI. Estos resultados demostraron que dicha forma fue capaz de alterar el equilibrio de la membrana de la especie hospedadora.
5. La expresión de *HaLPCAT1* y *HaLPCAT3* en levadura indujo un incremento significativo del contenido de TAG, lo que apunta a que estas enzimas intervienen en el proceso de acumulación de estos glicerolípidos. Este incremento, sin embargo, no fue significativo cuando las enzimas se coexpresaron con *CsFAD2*.
6. La expresión de los tres genes *HaLPCAT* en levadura causó un descenso del contenido de 18:1^{A11} en TAG, PC y PE. Esto indica que el intercambio de acilos inducido por las enzimas *LPCAT* es capaz de alterar la disponibilidad del sustrato 16:1^{A9}-CoA para las elongasas endógenas.
7. Cuando *CsFAD2* es coexpresada con *HaLPCAT1* en levadura se registró un aumento de la incorporación de 18:2 y PUFA totales en TAG y PE y solo en PE cuando se expresó *HaLPCAT3*, indicando que estas dos formas pueden estar implicadas en facilitar el flujo de PUFA desde PC hasta otras especies de glicerolípidos.
8. Las enzimas *HaLPCAT* fueron capaces de alterar la composición del conjunto de acil-CoA de levaduras. Así la expresión de *HaLPCAT2* y *HaLPCAT3* dio lugar a un incremento del contenido de 18:1-CoA del mismo, lo cual indica que la dinamización del flujo de acilos favoreció la desaturación de 18:0-CoA. Por otra parte, en presencia de *CsFAD2* las enzimas *HaLPCAT* incrementaron el contenido de 18:2-CoA en el conjunto de acil-CoA, registrándose en todos los casos un aumento de la conversión aparente de 18:1 a 18:2. Este resultado demuestra, una vez más, que las enzimas *LPCAT*, al favorecer la circulación de acilos, incrementan la producción y distribución de PUFA en distintas especies de lípidos.

9. Las enzimas *HaLPCAT* de girasol fueron ensayadas *in vitro* en preparaciones de microsomas de levadura. Se ensayaron y caracterizaron tanto la reacción directa como la inversa. Los perfiles de especificidad de ambas reacciones fueron similares, mostrando preferencia por los acil-CoA y glicerofosfolípidos poliinsaturados, lo que refuerza la idea de que estas enzimas favorecen el intercambio de los grupos acilos poliinsaturados entre las distintas especies de lípidos.
10. Las 3 enzimas *HaLPCAT* fueron capaces de complementar al mutante de Arabidopsis *Atlpcat1/Atlpcat2*, incrementando su contenido en PUFA y disminuyendo su contenido en 20:1^{Δ11}, demostrando que dichas enzimas fueron funcionales en plantas realizando un papel análogo a las formas endógenas que fueron desactivadas en el mencionado mutante.
11. En el presente trabajo se clonó un gen *PDCT* de girasol a partir de ADNc de semillas, que codificaba una proteína cuya secuencia aminoacídica fue similar a la de otras proteínas *PDCT* descritas previamente. Se encontraron en su secuencia 6 dominios transmembrana y se clasificó como una enzima integrada en la misma con una localización en el retículo endoplásmico. Esta proteína está evolutivamente muy relacionada con proteínas *PDCT* de otras plantas de la subclase de las *Asteridae*.
12. El gen *HaPDCT* mostró una expresión en semillas en desarrollo mucho mayor que en los tejidos vegetativos analizados, por lo que puede concluirse que la expresión fue específica para el mencionado órgano y su función relacionada con la síntesis de TAG en semillas.
13. La enzima *HaPDCT* fue expresada en levadura, no encontrándose modificaciones en la composición de ácidos grasos en las células que la expresaban. Tampoco ejerció influencia alguna en la acumulación de PUFA cuando fue coexpresada con *CsFAD2*.
14. La proteína *PDCT* de girasol fue ensayada en microsomas de levadura, midiéndose su actividad *in vitro*. Un estudio de especificidad de sustrato mostró que dicha enzima fue muy inespecífica, no mostrando preferencia para la canalización de ninguna forma concreta de PC a DAG, por lo que se dedujo que su papel en la acumulación de PUFA en los TAG de girasol parece ser secundario.

VI. BIBLIOGRAFÍA

6. BIBLIOGRAFÍA

Abbadí A., Domergue F., Bauer J., Napier J. A., Welti R., Zähringer U., Cirpus P., & Heinz E. Biosynthesis of very-long-chain polyunsaturated fatty acids in transgenic oilseeds: constraints on their accumulation. *Plant Cell* 16, 2734-2748 (2004).

Alba Ordoñez A. & Llanos Company M. *El cultivo del girasol*. (Mundi-Prensa, 1990).

Almagro Armenteros J. J., Sønderby C. K., Sønderby S. K., Nielsen H., & Winther O. DeepLoc: prediction of protein subcellular localization using deep learning. *Bioinformatics* 33, 3387-3395 (2017).

Altschul S. F., Gish W., Miller W., Myers E. W., & Lipman D. J. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403-410 (1990).

An G., Ebert P. R., Amitava M., & Ha S. B. Binary vectors. en *Plant molecular biology manual* (ed. Gelvin, S. B.) 1-19 (Kluwer Academic Publishers, 1988).

Antonsson B. Phosphatidylinositol synthase from mammalian tissues. *Biochim. Biophys. Acta* 1348, 179-186 (1997).

Arisz S. A., Testerink C., & Munnik T. Plant PA signaling via diacylglycerol kinase. *Biochim. Biophys. Acta* 1791, 869-875 (2009).

Arondel V., Lemieux B., Hwang I., Gibson S., Goodman H. M., & Somerville C. R. Map-Based cloning of a gene controlling omega-3 fatty acid desaturation in *Arabidopsis*. *Science* (80-.). 258, 1353-1355 (1992).

Arroyo-Caro J. M., Chileh T., López Alonso D., & García-Maroto F. Molecular characterization of a lysophosphatidylcholine acyltransferase gene belonging to the MBOAT family in *Ricinus communis* L. *Lipids* 48, 663-674 (2013).

Autino H., Wnuk F., & Vacca P. Historia, presente y futuro de una oleaginosa atractiva: el girasol. en *Aceites y grasas* 21-30 (ASAGA, 1993).

Aznar-Moreno J. A., Martínez-Force E., Venegas-Calderón M., Garcés R., & Salas J. J. Changes in acyl-coenzyme A pools in sunflower seeds with modified fatty acid composition. *Phytochemistry* 87, 39-50 (2013).

Aznar-Moreno J. A., Venegas-Calderón M., Martínez-Force E., Garcés R., Mullen R., Gidda S. K., & Salas J. J. Sunflower (*Helianthus annuus*) long-chain acyl-coenzyme A synthetases expressed at high levels in developing seeds. *Physiol. Plant.* 150, 363-373 (2014).

Bafor M., Smith M. A., Jonsson L., Stobart K., & Stymne S. Ricinoleic acid biosynthesis and triacylglycerol assembly in microsomal preparations from developing castor-bean (*Ricinus communis*) endosperm. *Biochem. J.* 280, 507-514 (1991).

Banaś A., Dahlqvist A., Ståhl U., Lenman M., & Stymne S. The involvement of phospholipid:diacylglycerol acyltransferases in triacylglycerol production. *Biochem. Soc. Trans.* 28, 703-705 (2000).

Banaś A., Johansson I., & Stymne S. Plant microsomal phospholipases exhibit preference for phosphatidylcholine with oxygenated acyl groups. *Plant Sci.* 84, 137-144 (1992).

Banaś W., Sánchez García A., Banaś A., & Stymne S. Activities of acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase (DGAT) and phospholipid:diacylglycerol acyltransferase (PDAT) in microsomal preparations of developing sunflower and safflower seeds. *Planta* 237, 1627-1636 (2013).

- Bao X., Pollard M., & Ohlrogge J. The biosynthesis of erucic acid in developing embryos of *Brassica rapa*. *Plant Physiol.* 118, 183-190 (1998).
- Barron E. J. & Stumpf P. K. Fat metabolism in higher plants. The biosynthesis of triglycerides by avocado-mesocarp enzymes. *Biochim. Biophys. Acta* 60, 329-337 (1962).
- Bates P. D. Understanding the control of acyl flux through the lipid metabolic network of plant oil biosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta* 1861, 1214-1225 (2016).
- Bates P. D., Durrett T. P., Ohlrogge J. B., & Pollard M. Analysis of acyl fluxes through multiple pathways of triacylglycerol synthesis in developing soybean embryos. *Plant Physiol.* 150, 55-72 (2009).
- Bates P. D., Fatihi A., Snapp A. R., Carlsson A. S., Browse J., & Lu C. Acyl editing and headgroup exchange are the major mechanisms that direct polyunsaturated fatty acid flux into triacylglycerols. *Plant Physiol.* 160, 1530-1539 (2012).
- Bates P. D., Ohlrogge J. B., & Pollard M. Incorporation of newly synthesized fatty acids into cytosolic glycerolipids in pea leaves occurs via acyl editing. *J. Biol. Chem.* 282, 31206-31216 (2007).
- Bates P. D. & Browse J. The significance of different diacylglycerol synthesis pathways on plant oil composition and bioengineering. *Front. Plant Sci.* 3, 1-11 (2012).
- Bates P. D. & Browse J. The pathway of triacylglycerol synthesis through phosphatidylcholine in *Arabidopsis* produces a bottleneck for the accumulation of unusual fatty acids in transgenic seeds. *Plant J.* 68, 387-399 (2011).
- Baud S. & Lepiniec L. Physiological and developmental regulation of seed oil production. *Prog. Lipid Res.* 49, 235-249 (2010).
- Beaudoin F. & Napier J. A. Biosynthesis and compartmentation of triacylglycerol in higher plants. en *Topics in current genetics* (ed. Daum, G.) vol. 6 267-287 (Springer, 2004).
- Benghezal M., Roubaty C., Veepuri V., Knudsen J., & Conzelmann A. SLC1 and SLC4 encode partially redundant acyl-coenzyme A 1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferases of budding yeast. *J. Biol. Chem.* 282, 30845-30855 (2007).
- Benghezal M., Wasteneys G. O., & Jones D. A. The C-terminal dilysine motif confers endoplasmic reticulum localization to type I membrane proteins in plants. *Plant Cell* 12, 1179-1201 (2000).
- Berg J. M., Tymoczko J. L., & Stryer L. Triacylglycerols are highly concentrated energy stores. en *Biochemistry* (ed. Freeman, W. H.) (W. H. Freeman and Company, 2002).
- Block M. A., Bubots E., & Maréchal E. Glycerolipid biosynthesis and chloroplast biogenesis. en *Plastid development in leaves during growth and senescence* (eds. Biswal, B., Krupinska, K. & Biswal, U. C.) 131-154 (Springer, 2013).
- Bockisch M. Vegetable Fats and Oils. en *Fats and oils handbook* 174-344 (1998).
- Bonangelino C. J., Nau J. J., Duex J. E., Brinkman M., Wurmser A. E., Gary J. D., Emr S. D., & Weisman L. S. Osmotic stress-induced increase of phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate requires Vac14p, an activator of the lipid kinase Fab1p. *J. Cell Biol.* 156, 1015-1028 (2002).
- Bouvier-Navé P., Benveniste P., Oelkers P., Sturley S. L., & Schaller H. Expression in yeast and tobacco of plant cDNAs encoding acyl CoA:diacylglycerol acyltransferase. *Eur. J. Biochem.* 267, 85-96 (2000).

- Broun P., Boddupalli S., & Somerville C. A bifunctional oleate 12-hydroxylase: Desaturase from *Lesquerella fendleri*. *Plant J.* 13, 201-210 (1998).
- Brown A. P., Affleck V., Fawcett T., & Slabas A. R. Tandem affinity purification tagging of fatty acid biosynthetic enzymes in *Synechocystis* sp. PCC6803 and *Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Bot.* 57, 1563-1571 (2006).
- Brown H. A. & Murphy R. C. Working towards an exegesis for lipids in biology. *Nat. Chem. Biol.* 5, 602-6 (2009).
- Burdge G. C. & Calder P. C. α -Linolenic acid metabolism in adult humans: The effects of gender and age on conversion to longer-chain polyunsaturated fatty acids. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 107, 426-439 (2005).
- Burgal J., Shockey J., Lu C., Dyer J., Larson T., Graham I., & Browse J. Metabolic engineering of hydroxy fatty acid production in plants: RcDGAT2 drives dramatic increases in ricinoleate levels in seed oil. *Plant Biotechnol. J.* 6, 819-831 (2008).
- Cahoon E. B., Shockey J. M., Dietrich C. R., Gidda S. K., Mullen R. T., & Dyer J. M. Engineering oilseeds for sustainable production of industrial and nutritional feedstocks: solving bottlenecks in fatty acid flux. *Curr. Opin. Plant Biol.* 10, 236-244 (2007).
- Campbell E. J. Sunflower oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 60, 387-392 (1983).
- Cao H. Structure-function analysis of diacylglycerol acyltransferase sequences from 70 organisms. *BMC Res. Notes* 4, 1-23 (2011).
- Cao J., Shan D., Revett T., Li D., Wu L., Liu W., Tobin J. F., & Gimeno R. E. Molecular identification of a novel mammalian brain isoform of acyl-CoA:Lysophospholipid acyltransferase with prominent ethanolamine lysophospholipid acylating activity, LPEAT2. *J. Biol. Chem.* 283, 19049-19057 (2008).
- Cases S., Smith S. J., Zheng Y.-W., Myers H. M., Lear S. R., Sande E., Novak S., Collins C., Welch C. B., Lusi A. J., Erickson S. K., & Farese R. V. Identification of a gene encoding an acyl CoA:diacylglycerol acyltransferase, a key enzyme in triacylglycerol synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 13018-13023 (1998).
- Chang C. C. Y., Sun J., & Chang T.-Y. Membrane-bound O-acyltransferases (MBOATs). *Front. Biol. (Beijing)*. 6, 177-182 (2011).
- Chapman K. D. & Ohlrogge J. B. Compartmentation of triacylglycerol accumulation in plants. *J. Biol. Chem.* 287, 2288-2294 (2012).
- Chen Q., Kazachkov M., Zheng Z., & Zou J. The yeast acylglycerol acyltransferase LCA1 is a key component of Lands cycle for phosphatidylcholine turnover. *FEBS Lett.* 581, 5511-5516 (2007).
- Chen X., Hyatt B. A., Mucenski M. L., Mason R. J., & Shannon J. M. Identification and characterization of a lysophosphatidylcholine acyltransferase in alveolar II cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 11724-11729 (2006).
- Chi Z., Kohlwein S. D., & Paltauf F. Role of phosphatidylinositol (PI) in ethanol production and ethanol tolerance by a high ethanol producing yeast. *en Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* vol. 22 58-63 (1999).
- Christie W. W. The lipid web (AOCS). Fatty Acids: Straight-Chain Monoenoic <https://www.lipidhome.co.uk> (2019).

- Claros M. G. & von Heijne G. Toppred II: An improved software for membrane protein structure predictions. *Bioinformatics* 10, 685-686 (1994).
- Clemente T. E. & Cahoon E. B. Soybean oil: Genetic approaches for modification of functionality and total content. *Plant Physiol.* 151, 1030-1040 (2009).
- Clough S. J. & Bent A. F. Floral dip: A simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 16, 735-743 (1998).
- Coleman R. A. & Lee D. P. Enzymes of triacylglycerol synthesis and their regulation. *Prog. Lipid Res.* 43, 134-176 (2004).
- Comisión Europea-Committee for the Common Organisation of Agricultural Markets. Oilseeds and protein crops market situation. 1-30 (2017).
- Cook H. W. Fatty acid desaturation and chain elongation in eukaryotes. en *Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes* (eds. Vance, D. E. & Vance, J. E.) 129-152 (Elsevier Science, 1996). doi:10.1016/S0167-7306(08)60333-6.
- Cowan A. K. Phospholipids as plant growth regulators. *Plant Growth Regul.* 48, 97-109 (2006).
- Dahlqvist A., Ståhl U., Lenman M., Banas A., Lee M., Sandager L., Ronne H., & Stymne S. Phospholipid:diacylglycerol acyltransferase: an enzyme that catalyzes the acyl-CoA-independent formation of triacylglycerol in yeast and plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 6487-6492 (2000).
- Damude H. G. & Kinney A. J. Enhancing plant seed oils for human nutrition. *Plant Physiol.* 147, 962-968 (2008).
- Das S., Castillo C., & Stevens T. Phospholipid remodeling/generation in *Giardia*: the role of the Lands cycle. *Trends Parasitol.* 17, 316-319 (2001).
- Badui Dergal S. Lípidos. en *Química de los alimentos* (ed. Quintanar Duarte, E.) 245-300 (Pearson Educación, 2006).
- Dehesh K., Edwards P., Fillatti J., Slabaugh M., & Byrne J. KAS IV: A 3-ketoacyl-ACP synthase from *Cuphea* sp. is a medium chain specific condensing enzyme. *Plant J.* 15, 383-390 (1998).
- Dörmann P. Membrane lipids. en *Plant lipids: biology, utilisation and manipulation* (ed. Murphy, D. J.) 123-161 (CRC Press, 2005).
- Durrett T. P., McClosky D. D., Tumaney A. W., Elzinga D. A., Ohlrogge J., & Pollard M. A distinct DGAT with sn-3 acetyltransferase activity that synthesizes unusual, reduced-viscosity oils in *Euonymus* and transgenic seeds. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 9464-9469 (2010).
- Dyer J. M. & Mullen R. T. Engineering plant oils as high-value industrial feedstocks for biorefining: the need for underpinning cell biology research. *Physiol. Plant.* 132, 11-22 (2008).
- Eckert H., La Vallee B., Schweiger B. J., Kinney A. J., Cahoon E. B., & Clemente T. Co-expression of the borage $\Delta 6$ desaturase and the *Arabidopsis* $\Delta 15$ desaturase results in high accumulation of stearidonic acid in the seeds of transgenic soybean. *Planta* 224, 1050-1057 (2006).
- Eichmann T. O. & Lass A. DAG tales: the multiple faces of diacylglycerol-stereochemistry, metabolism, and signaling. *Cell. Mol. Life Sci.* 72, 3931-3952 (2015).

- Elble R. A simple and efficient procedure for transformation of yeasts. *Biotechniques* 13, 18-20 (1992).
- Fahy E., Subramaniam S., Murphy R. C., Nishijima M., Raetz C. R. H., Shimizu T., Spener F., van Meer G., Wakelam M. J. O., & Dennis E. A. Update of the LIPID MAPS comprehensive classification system for lipids. *J. Lipid Res. Supplement*, S9-S14 (2009).
- Fahy E., Cotter D., Sud M., & Subramaniam S. Lipid classification, structures and tools. *Biochim. Biophys. Acta* 1811, 637-647 (2011).
- Fahy E., Subramaniam S., Brown H. A., Glass C. K., Merrill A. H., Murphy R. C., Raetz C. R. H., Russell D. W., Seyama Y., Shaw W., Shimizu T., Spener F., van Meer G., Van Nieuwenhze M. S., White S. H., Witztum J. L., & Dennis E. A. A comprehensive classification system for lipids. *J. Lipid Res.* 46, 839-861 (2005).
- FAO. Grasas y ácidos grasos en nutrición humana: consulta de expertos. Estudio FAO alimentación y nutrición 1-169 (2012) doi:978-92-5-3067336.
- Fernández-Moya V., Martínez-Force E., & Garcés R. Temperature effect on a high stearic acid sunflower mutant. *Phytochemistry* 59, 33-37 (2002).
- Feussner I. & Wasternack C. The lipoxygenase pathway. *Annu. Rev. Plant Biol.* 53, 275-297 (2002).
- Frentzen M. & Wolter F. P. No Title. en *Plant lipid biosynthesis* (ed. Harwood, J. L.) 247-272 (Cambridge University Press, 1988).
- Fujii S., Akiyama M., Aoki K., Sugaya Y., Higuchi K., Hiraoka M., Miki Y., Saitoh N., Yoshiyama K., Ihara K., Seki M., Ohtsubo E., & Maki H. DNA replication errors produced by the replicative apparatus of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 289, 835-850 (1999).
- Furukawa-Stoffer T. L., Boyle R. M., Thomson A. L., Sarna M. A., & Weselake R. J. Properties of lysophosphatidylcholine acyltransferase from *Brassica napus* cultures. *Lipids* 38, 651-656 (2003).
- Garcés R., Martínez-Force E., Salas J. J., & Venegas-Calderón M. Current advances in sunflower oil and its applications. *Lipid Technol.* 21, 79-82 (2009).
- Garcés R., García J. M., & Mancha M. Lipid characterization in seeds of a high oleic acid sunflower mutant. *Phytochemistry* 28, 2597-2600 (1989).
- Garcés R., Martínez-Force E., & Salas J. J. Vegetable oil basestocks for lubricants. *Grasas y Aceites* 62, 21-28 (2011).
- García-Moreno M. J., Vera-Ruiz E. M., Fernández-Martínez, José M. Velasco L., & Pérez-Vich B. Genetic and molecular analysis of high gamma-tocopherol content in sunflower. *Crop Sci. Soc. Am.* 46, 2015-2021 (2006).
- Gardocki M. E., Bakewell M., Kamath D., Robinson K., Borovicka K., & Lopes J. M. Genomic analysis of PIS1 gene expression. *Eukaryot. Cell* 4, 604-614 (2005).
- Gardocki M. E., Jani N., & Lopes J. M. Phosphatidylinositol biosynthesis: biochemistry and regulation. *Biochim. Biophys. Acta* 1735, 89-100 (2005).
- Gasteiger E., Hoogland C., Gattiker A., Duvaud S., Wilkins M. R., Appel R. D., & Bairoch A. Protein identification and analysis tools in the ExPASy server. en *The proteomics protocols handbook* (ed. Walker, J. M.) vol. 112 571-607 (Humana Press, 2005).

- Gerth K., Lin F., Menzel W., Krishnamoorthy P., Stenzel I., Heilmann M., & Heilmann I. Guilt by association: a phenotype-based view of the plant phosphoinositide network. *Annu. Rev. Plant Biol.* 68, 5.1-5.26 (2017).
- Ghosal A., Banas A., Ståhl U., Dahlqvist A., Lindqvist Y., & Stymne S. *Saccharomyces cerevisiae* phospholipid:diacylglycerol acyl transferase (PDAT) devoid of its membrane anchor region is a soluble and active enzyme retaining its substrate specificities. *Biochim. Biophys. Acta* 1771, 1457-1463 (2007).
- Gibellini F. & Smith T. K. The Kennedy pathway-de novo synthesis of phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine. *IUBMB Life* 62, 414-428 (2010).
- Gidda S. K., Shockey J. M., Rothstein S. J., Dyer J. M., & Mullen R. T. *Arabidopsis thaliana* GPAT8 and GPAT9 are localized to the ER and possess distinct ER retrieval signals: functional divergence of the dilysine ER retrieval motif in plant cells. *Plant Physiol. Biochem.* 47, 867-879 (2009).
- Gijón M. A., Riekhof W. R., Zarini S., Murphy R. C., & Voelker D. R. Lysophospholipid acyltransferases and arachidonate recycling in human neutrophils. *J. Biol. Chem.* 283, 30235-30245 (2008).
- Giniger E., Varnum S. M., & Ptashne M. Specific DNA binding of GAL4, a positive regulatory protein of yeast. *Cell* 40, 767-774 (1985).
- Glab B., Beganovic M., Anaokar S., Hao M.-S., Rasmusson A. G., Patton-Vogt J., Banaś A., Stymne S., & Lager I. Cloning of glycerophosphocholine acyltransferase (GPCAT) from fungi and plants: a novel enzyme in phosphatidylcholine synthesis. *J. Biol. Chem.* 291, 25066-25076 (2016).
- González-Mellado D., Salas J. J., Venegas-Calerón M., Moreno-Pérez A. J., Garcés R., & Martínez-Force E. Functional characterization and structural modelling of *Helianthus annuus* (sunflower) ketoacyl-CoA synthases and their role in seed oil composition. *Planta* 249, 1823-1836 (2019).
- Ayerdi Gotor A. & Rhazi L. Effects of refining process on sunflower oil minor components: a review. *OCL - Oilseeds fats, Crop. Lipids* 23, (2016).
- Graham I. A., Larson T., & Napier J. A. Rational metabolic engineering of transgenic plants for biosynthesis of omega-3 polyunsaturates. *Curr. Opin. Biotechnol.* 18, 142-147 (2007).
- Hall T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 41, 95-98 (1999).
- Harayama T., Shindou H., Ogasawara R., Suwabe A., & Shimizu T. Identification of a novel noninflammatory biosynthetic pathway of platelet-activating factor. *J. Biol. Chem.* 283, 11097-11106 (2008).
- Harris H. C., McWilliam J. R., & Mason W. K. Influence of temperature on oil content and composition of sunflower seed. *Aust. J. Agric. Res.* 29, 1203-1212 (1978).
- Harrison S. J., Mott E. K., Parsley K., Aspinall S., Gray J. C., & Cottage A. A rapid and robust method of identifying transformed *Arabidopsis thaliana* seedlings following floral dip transformation. *Plant Methods* 2, 1-7 (2006).
- Harwood J. L. Fatty acid biosynthesis. en *Plant lipids: biology, utilisation and manipulation* (ed. Murphy, D. J.) 27-66 (CRC Press, 2005).

- Harwood J. L. Recent advances in the biosynthesis of plant fatty acids. *Biochim. Biophys. Acta* 1301, 7-56 (1996).
- Harwood J. L. Lipid metabolism. en *The lipid handbook* (eds. Gunstone, F. D., Harwood, J. L. & Dijkstra, A. J.) 637-702 (CRC Press, 2007).
- Harwood J. L. The synthesis of acyl lipids in plant tissues. *Prog. Lipid Res.* 18, 55-86 (1979).
- Heath R. J. & Rock C. O. A conserved histidine is essential for glycerolipid acyltransferase catalysis. *J. Bacteriol.* 180, 1425-1430 (1998).
- Heilmann I. Phosphoinositide signaling in plant development. *Development* 143, 2044-2055 (2016).
- Hernández M. L., Whitehead L., He Z., Gazda V., Gilday A., Kozhevnikova E., Vaistij F. E., Larson T. R., & Graham I. A. A cytosolic acyltransferase contributes to triacylglycerol synthesis in sucrose-rescued Arabidopsis seed oil catabolism mutants. *Plant Physiol.* 160, 215-225 (2012).
- Hills M. J. & Roscoe T. J. Synthesis of structural and storage lipids by the ER. en *The plant endoplasmic reticulum* (ed. Robinson, D. G.) 155-186 (Springer, 2006). doi:10.1007/7089_056.
- Hishikawa D., Shindou H., Kobayashi S., Nakanishi H., Taguchi R., & Shimizu T. Discovery of a lysophospholipid acyltransferase family essential for membrane asymmetry and diversity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 2830-2835 (2008).
- Hjelmstad R. H., Morash S. C., McMaster C. R., & Bell R. M. Chimeric enzymes. Structure-function analysis of segments of sn-1,2-diacylglycerol choline- and ethanolaminephosphotransferases. *J. Biol. Chem.* 269, 20995-21002 (1994).
- Hobbs D. H., Lu C., & Hills M. J. Cloning of a cDNA encoding diacylglycerol acyltransferase from Arabidopsis thaliana and its functional expression. *Fed. Eur. Biochem. Soc.* 452, 145-149 (1999).
- Hofmann K. A superfamily of membrane-bound O-acyltransferases with implications for Wnt signaling. *Trends Biochem. Sci.* 25, 111-112 (2000).
- Hu Z., Ren Z., & Lu C. The phosphatidylcholine diacylglycerol cholinephosphotransferase is required for efficient hydroxy fatty acid accumulation in transgenic Arabidopsis. *Plant Physiol.* 158, 1944-1954 (2012).
- Huitema K., van den Dikkenberg J., Brouwers J. F. H. M., & Holthuis J. C. M. Identification of a family of animal sphingomyelin synthases. *EMBO J.* 23, 33-44 (2004).
- Ichihara K. The action of phosphatidate phosphatase on the fatty-acid composition of safflower triacylglycerol and spinach glycerolipids. *Planta* 183, 353-358 (1991).
- IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature. Basic terminology of stereochemistry- IUPAC recommendations 1966. *Pure Appl. Chem.* 68, 2193-2222 (1996).
- IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature. Glossary of class names of organic compounds and reactive intermediates based on structure- IUPAC recommendations 1995. *Pure Appl. Chem.* 67, 1307-1375 (1995).
- IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature. The nomenclature of lipids- IUPAC recommendations 1976. *Biochem. J.* 171, 21-35 (1978).

- Jackson M., Crick D. C., & Brennan P. J. Phosphatidylinositol is an essential phospholipid of mycobacteria. *J. Biol. Chem.* 275, 30092-30099 (2000).
- Jain S., Stanford N. T., Bhagwat N., Seiler B., Costanzo M., Boone C., & Oelkers P. Identification of a novel lysophospholipid acyltransferase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 282, 30562-30569 (2007).
- Jansen G., Wu C., Schade B., Thomas D. Y., & Whiteway M. Drag&Drop cloning in yeast. *Gene* 344, 43-51 (2005).
- Jasieniecka-Gazarkiewicz K., Demski K., Lager I., Szymne S., & Banaś A. Possible Role of Different Yeast and Plant Lysophospholipid:Acyl-CoA Acyltransferases (LPLATs) in Acyl Remodelling of Phospholipids. *Lipids* 51, 15-23 (2016).
- Jaworski J. G., Clough R. C., & Barnum S. R. A cerulenin insensitive short chain 3-ketoacyl-acyl carrier protein synthase in *Spinacia oleracea* leaves. *Plant Physiol.* 90, 41-44 (1989).
- Jain S., Zhang X., Khandelwal P. J., Saunders A. J., Cummings B. S., & Oelkers P. Characterization of human lysophospholipid acyltransferase 3. *J. Lipid Res.* 50, 1563-1570 (2009).
- Jones A., Davies H. M., & Voelker T. A. Palmitoyl-acyl carrier protein (ACP) thioesterase and the evolutionary origin of plant acyl-ACP thioesterases. *Plant Cell* 7, 359-371 (1995).
- Kachroo A. & Kachroo P. Fatty Acid-Derived Signals in Plant Defense. *Annu. Rev. Phytopathol.* 47, 153-176 (2009).
- Kanda P. & Wells M. A. Facile acylation of glycerophosphocholine catalyzed by trifluoroacetic anhydride. *J. Lipid Res.* 22, 877-879 (1981).
- Katan M. B., Zock P. L., & Mensink R. P. Dietary oils, serum lipoproteins, and coronary heart disease. *Am. J. Clin. Nutr.* 61 (suppl), 1368S-1373S (1995).
- Kazachkov M., Chen Q., Wang L., & Zou J. Substrate preferences of a lysophosphatidylcholine acyltransferase highlight its role in phospholipid remodeling. *Lipids* 43, 895-902 (2008).
- Kennedy E. P. Biosynthesis of complex lipids. *Fed. Proc.* 20, 934-940 (1961).
- Kim H. U. & Huang A. H. C. Plastid lysophosphatidyl acyltransferase is essential for embryo development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 134, 1206-1216 (2004).
- Kim H. U., Li Y., & Huang A. H. C. Ubiquitous and endoplasmic reticulum – located lysophosphatidyl acyltransferase , LPAT2 , is essential for female but not male gametophyte development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 17, 1073-1089 (2005).
- Kinney A. J. & Moore T. S. Phosphatidylcholine synthesis in castor bean endosperm: the localization and control of CTP:choline-phosphate cytidyltransferase activity. *Arch. Biochem. Biophys.* 259, 15-21 (1987).
- Kleingartner L. W. NuSun sunflower oil: redirection of an industry. en *Trends in new crops and new uses* (eds. Janick, J. & Whipkey, A.) 135-138 (ASHS Press, 2002).
- Koncz C. & Schell J. The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Mol. Gen. Genet.* 204, 383-396 (1986).

- Konishi T., Shinohara K., Yamada K., & Sasaki Y. Acetyl-CoA carboxylase in higher plants: Most plants other than gramineae have both the prokaryotic and the eukaryotic forms of this enzyme. *Plant Cell Physiol.* 37, 117-122 (1996).
- Kroon J. T. M., Wei W., Simon W. J., & Slabas A. R. Identification and functional expression of a type 2 acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase (DGAT2) in developing castor bean seeds which has high homology to the major triglyceride biosynthetic enzyme of fungi and animals. *Phytochemistry* 67, 2541-2549 (2006).
- Kyte J. & Doolittle R. F. A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. *J. Mol. Biol.* 157, 105-132 (1982).
- Lager I., Glab B., Eriksson L., Chen G., Banas A., & Stymne S. Novel reactions in acyl editing of phosphatidylcholine by lysophosphatidylcholine transacylase (LPCT) and acyl-CoA:glycerophosphocholine acyltransferase (GPCAT) activities in microsomal preparations of plant tissues. *Planta* 241, 347-358 (2015).
- Lager I., Yilmaz J. L., Zhou X.-R., Jasieniecka K., Kazachkov M., Wang P., Zou J., Weselake R., Smith M. A., Bayon S., Dyer J. M., Shockey J. M., Heinz E., Green A., Banas A., & Stymne S. Plant acyl-CoA:lysophosphatidylcholine acyltransferases (LPCATs) have different specificities in their forward and reverse reactions. *J. Biol. Chem.* 288, 36902-36914 (2013).
- Lands W. E. M. Lipid metabolism. *Annu. Rev. Biochem.* 34, 313-346 (1965).
- Lardizabal K. D., Mai J. T., Wagner N. W., Wyrick A., Voelker T., & Hawkins D. J. DGAT2 is a new diacylglycerol acyltransferase gene family. Purification, cloning, and expression in insect cells of two polypeptides from *Mortierella ramanniana* with diacylglycerol acyltransferase activity. *J. Biol. Chem.* 276, 38862-38869 (2001).
- Larkin M. A., Blackshields G., Brown N. P., Chenna R., McGettigan P. A., McWilliam H., Valentin F., Wallace I. M., Wilm A., Lopez R., Thompson J. D., Gibson T. J., & Higgins D. G. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23, 2947-2948 (2007).
- Larson T. R. & Graham I. A. A novel technique for the sensitive quantification of acyl CoA esters from plant tissues. *Plant J.* 25, 115-125 (2001).
- Larsson K. E., Kjellberg J. M., Tjellström H., & Sandelius A. S. LysoPC acyltransferase/PC transacylase activities in plant plasma membrane and plasma membrane-associated endoplasmic reticulum. *BMC Plant Biol.* 7, 1-12 (2007).
- Lee M., Lenman M., Banaś A., Bafor M., Singh S., Schweizer M., Nilsson R., Liljenberg C., Dahlqvist A., Gummesson P., Sjö Dahl S., Green A., & Stymne S. Identification of non-heme diiron proteins that catalyze triple bond and epoxy group formation. *Science* (80-). 280, 915-918 (1998).
- Lehner R. & Kuksis A. Triacylglycerol synthesis by an sn- 1,2(2,3)-diacylglycerol transacylase from rat intestinal microsomes. *J. Biol. Chem.* 268, 8781-8786 (1993).
- Lehner R. & Kuksis A. Biosynthesis of triacylglycerols. *Prog. Lipid Res.* 35, 169-201 (1996).
- Lewin T. M., Wang P., & Coleman R. A. Analysis of amino acid motifs diagnostic for the sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase reaction. *Biochemistry* 38, 5764-5771 (1999).
- Lexer C., Welch M. E., Durphy J. L., & Rieseberg L. H. Natural selection for salt tolerance quantitative trait loci (QTLs) in wild sunflower hybrids: implications for the origin of *Helianthus paradoxus*, a diploid hybrid species. *Mol. Ecol.* 12, 1225-1235 (2003).

- Li R., Yu K., Hatanaka T., & Hildebrand D. F. Vernonia DGATs increase accumulation of epoxy fatty acids in oil. *Plant Biotechnol. J.* 8, 184-195 (2010).
- Li R., Yu K., & Hildebrand D. F. DGAT1, DGAT2 and PDAT expression in seeds and other tissues of epoxy and hydroxy fatty acid accumulating plants. *Lipids* 45, 145-157 (2010).
- Li-Beisson Y., Shorrosh B., Beisson F., Andersson M. X., Arondel V., Bates P. D., Baud S., Bird D., DeBono A., Durrett T. P., Franke R. B., Graham I. A., Katayama K., Kelly A. A., Larson T., Markham J. E., Miquel M., Molina I., Nishida I., Rowland O., Samuels L., Schmid K. M., Wada H., Welti R., Xu C., Zallot R., & Ohlrogge J. Acyl-lipid metabolism. en *The Arabidopsis book* (ed. Biologists, A. S. of P.) vol. 11 1-70 (American Society of Plant Biologists, 2013).
- Lin J.-T., Chen J. M., Chen P., Liao L. P., & McKeon T. A. Molecular species of PC and PE formed during castor oil biosynthesis. *Lipids* 37, 991-995 (2002).
- Liu Q., Siloto R. M. P., Lehner R., Stone S. J., & Weselake R. J. Acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase: Molecular biology, biochemistry and biotechnology. *Prog. Lipid Res.* 51, 350-377 (2012).
- Livak K. J. & Schmittgen T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* 25, 402-408 (2001).
- Lööke M., Kristjuhan K., & Kristjuhan A. Extraction of genomic DNA from yeastsR PCR-based applications. *Biotechniques* 50, 325-328 (2011).
- Lu C., Xin Z., Ren Z., Miquel M., & Browse J. An enzyme regulating triacylglycerol composition is encoded by the ROD1 gene of Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 18837-18842 (2009).
- Lung S.-C. & Weselake R. J. Diacylglycerol acyltransferase: A key mediator of plant triacylglycerol synthesis. *Lipids* 41, 1073-1088 (2006).
- Mancha M. & Stymne S. Remodelling of triacylglycerols in microsomal preparations from developing castor bean (*Ricinus communis* L.) endosperm. *Planta* 203, 51-57 (1997).
- Marchler-Bauer A., Bo Y., Han L., He J., Lanczycki C. J., Lu S., Chitsaz F., Derbyshire M. K., Geer R. C., Gonzales N. R., Gwadz M., Hurwitz D. I., Lu F., Marchler G. H., Song J. S., Thanki N., Wang Z., Yamashita R. A., Zhang D., Zheng C., Geer L. Y., & Bryant S. H. CDD/SPARCLE: Functional classification of proteins via subfamily domain architectures. *Nucleic Acids Res.* 45, D200-D203 (2017).
- Marchler-Bauer A. & Bryant S. H. CD-Search: Protein domain annotations on the fly. *Nucleic Acids Res.* 32, 327-331 (2004).
- Marchler-Bauer A., Derbyshire M. K., Gonzales N. R., Lu S., Chitsaz F., Geer L. Y., Geer R. C., He J., Gwadz M., Hurwitz D. I., Lanczycki C. J., Lu F., Marchler G. H., Song J. S., Thanki N., Wang Z., Yamashita R. A., Zhang D., Zheng C., & Bryant S. H. CDD: NCBI's conserved domain database. *Nucleic Acids Res.* 43, D222-D226 (2015).
- Marchler-Bauer A., Lu S., Anderson J. B., Chitsaz F., Derbyshire M. K., DeWeese-Scott C., Fong J. H., Geer L. Y., Geer R. C., Gonzales N. R., Gwadz M., Hurwitz D. I., Jackson J. D., Ke Z., Lanczycki C. J., Lu F., Marchler G. H., Mullokandov M., Omelchenko M. V., Robertson C. L., Song J. S., Thanki N., Yamashita R. A., Zhang D., Zhang N., Zheng C., & Bryant S. H. CDD: A Conserved Domain Database for the functional annotation of proteins. *Nucleic Acids Res.* 39, D225-D229 (2011).

- Martínez-Force E., Álvarez-Ortega R., Cantisán S., & Garcés R. Fatty acid composition in developing high saturated sunflower (*Helianthus annuus*) seeds: maturation changes and temperature effect. *J. Agric. Food Chem.* 46, 3577-3582 (1998).
- Matsuda S., Inoue T., Lee H.-C., Kono N., Tanaka F., Gengyo-Ando K., Mitani S., & Arai H. Member of the membrane-bound O-acyltransferase (MBOAT) family encodes a lysophospholipid acyltransferase with broad substrate specificity. *Genes to Cells* 13, 879-888 (2008).
- McGarry J. D. Metabolismo lipídico I: utilización y almacenamiento de energía en forma de lípidos. en *Bioquímica: libro de texto con aplicaciones clínicas* (ed. Devlin, T. M.) 693-726 (Reverté, 2004).
- McKeon T. A., Lin J.-T., & Stafford A. E. Biosynthesis of ricinoleate in castor oil. en *Chemicals via higher plant bioengineering* (eds. Shahidi, F., Kolodziejczyk, P., Whitaker, J. R., Munguia, A. L. & Fuller, G.) 37-47 (Kluwer Academic Publishers, Plenum Publisher, 1999). doi:10.1007/978-1-4615-4729-7_4.
- Menard G. N., Moreno J. M., Bryant F. M., Munoz-Azcarate O., Kelly A. A., Hassani-Pak K., Kurup S., & Eastmond P. J. Genome wide analysis of fatty acid desaturation and its response to temperature. *Plant Physiol.* 173, 1594-1605 (2017).
- Mensink R. P., Zock P. L., Kester A. D. M., & Katan M. B. Effects of dietary fatty acids and carbohydrates on the ratio of serum total to HDL cholesterol and on serum lipids and apolipoproteins: A meta-analysis of 60 controlled trials. *Am. J. Clin. Nutr.* 77, 1146-1155 (2003).
- Miège C. & Maréchal É. 1,2-sn-Diacylglycerol in plant cells: product, substrate and regulator. *Plant Physiol. Biochem.* 37, 795-808 (1999).
- Miquel M. & Browse J. Arabidopsis mutants deficient in polyunsaturated fatty acid synthesis: biochemical and genetic characterization of a plant oleoyl-phosphatidylcholine desaturase. *J. Biol. Chem.* 267, 1502-1509 (1992).
- Mo J. Y., Maki H., & Sekiguchi M. Mutational specificity of the dnaE173 mutator associated with a defect in the catalytic subunit of DNA polymerase III of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 222, 925-936 (1991).
- Moreau P., Bessoule J. J., Mongrand S., Testet E., Vincent P., & Cassagne C. Lipid trafficking in plant cells. *Prog. Lipid Res.* 37, 371-391 (1998).
- Moreau R. A. & Stumpf P. K. Recent studies of the enzymic synthesis of ricinoleic acid by developing castor beans. *Plant Physiol.* 67, 672-676 (1981).
- Mortimer R. K. & Johnston J. R. Genealogy of principal strains of the yeast genetic stock center. *Genetics* 113, 35-43 (1986).
- Mumberg D., Müller R., & Funk M. Yeast vectors for the controlled expression of heterologous proteins in different genetic backgrounds. *Gene* 156, 119-122 (1995).
- Munnik T. & Testerink C. Plant phospholipid signaling: «in a nutshell». *J. Lipid Res.* 50, S260-S265 (2009).
- Murphy D. J., Hernández-Pinzón I., & Patel K. Role of lipid bodies and lipid-body proteins in seeds and other tissues. *J. Plant Physiol.* 158, 471-478 (2001).
- Murray M. G. & Thompson W. F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res.* 8, 4321-2598 (1980).

- Nakanishi H., Shindou H., Hishikawa D., Harayama T., Ogasawara R., Suwabe A., Taguchi R., & Shimizu T. Cloning and characterization of mouse lung-type acyl-CoA: lysophosphatidylcholine acyltransferase 1 (LPCAt1): expression in alveolar type II cells and possible involvement in surfactant production. *J. Biol. Chem.* 281, 20140-20147 (2006).
- Napier J. A. The production of unusual fatty acids in transgenic plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 58, 295-319 (2007).
- Napier J. A. & Graham I. A. Tailoring plant lipid composition: Designer oilseeds come of age. *Curr. Opin. Plant Biol.* 13, 330-337 (2010).
- Napier J. a, Haslam R. P., Beaudoin F., & Cahoon E. B. Understanding and manipulating plant lipid composition: Metabolic engineering leads the way. *Curr. Opin. Plant Biol.* 19, 68-75 (2014).
- Nikawa J. ichi & Yamashita S. Phosphatidylinositol synthase from yeast. *Biochim. Biophys. Acta* 1348, 173-178 (1997).
- Nishida I. & Murata N. Chilling sensitivity in plants and cyanobacteria: the crucial contribution of membrane lipids. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47, 541-568 (1996).
- Oelkers P., Cromley D., Padamsee M., Billheimer J. T., & Sturley S. L. The DGA1 gene determines a second triglyceride synthetic pathway in yeast. *J. Biol. Chem.* 277, 8877-8881 (2002).
- Ohlrogge J. & Browse J. Lipid Biosynthesis. *Plant Cell* 7, 957-970 (1995).
- Okuley J., Lightner J., Feldmann K., Yadav N., Lark E., & Browse J. Arabidopsis FAD2 gene encodes the enzyme that is essential for polyunsaturated lipid synthesis. *Plant Cell* 6, 147-158 (1994).
- O'Quin J. B., Bourassa L., Zhang D., Shockey J. M., Gidda S. K., Fosnot S., Chapman K. D., Mullen R. T., & Dyer J. M. Temperature-sensitive post-translational regulation of plant omega-3 fatty-acid desaturases is mediated by the endoplasmic reticulum-associated degradation pathway. *J. Biol. Chem.* 285, 21781-21796 (2010).
- Pan X., Chen G., Kazachkov M., Greer M. S., Caldo K. M. P., Zou J., & Weselake R. J. In vivo and in vitro evidence for biochemical coupling of reactions catalyzed by lysophosphatidylcholine acyltransferase and diacylglycerol acyltransferase. *J. Biol. Chem.* 290, 18068-18078 (2015).
- Parthibane V., Rajakumari S., Venkateshwari V., Iyappan R., & Rajasekharan R. Oleosin is bifunctional enzyme that has both monoacylglycerol acyltransferase and phospholipase activities. *J. Biol. Chem.* 287, 1946-1954 (2012).
- Pedroche J. Utilization of sunflower proteins. en *Sunflower: chemistry, production, processing, and utilization* (eds. Martínez-Force, E., Dunford, N. T. & Salas, J. J.) 395-440 (AOCS Press, 2015).
- Pinzi S., Garcia I. L., Lopez-Gimenez F. J., DeCastro M. D. L., Dorado G., & Dorado M. P. The ideal vegetable oil-based biodiesel composition: a review of social, economical and technical implications. *Energy and Fuels* 23, 2325-2341 (2009).
- Rani S. H., Krishna T. H. A., Saha S., Negi A. S., & Rajasekharan R. Defective in cuticular ridges (DCR) of *Arabidopsis thaliana*, a gene associated with surface cutin formation, encodes a soluble diacylglycerol acyltransferase. *J. Biol. Chem.* 285, 38337-38347 (2010).

- Richard M. G. & McMaster C. R. Lysophosphatidylcholine acyltransferase activity in *Saccharomyces cerevisiae*: Regulation by a high-affinity Zn²⁺ binding site. *Lipids* 33, 1229-1234 (1998).
- Riediger N. D., Othman R. A., Suh M., & Moghadasian M. H. A systemic review of the roles of n-3 fatty acids in health and disease. *J. Am. Diet. Assoc.* 109, 668-679 (2009).
- Riekhof W. R., Wu J., Gijón M. A., Zarini S., Murphy R. C., & Voelker D. R. Lysophosphatidylcholine metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: the role of P-type ATPases in transport and a broad specificity acyltransferase in acylation. *J. Biol. Chem.* 282, 36853-36861 (2007).
- Ririe K. M., Rasmussen R. P., & Wittwer C. T. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Anal. Biochem.* 245, 154-160 (1997).
- Robertson J. A., Chapman G. W., & Wilson R. L. Relation of days after flowering to chemical composition and physiological maturity of sunflower seed. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 55, 266-269 (1978).
- Rodríguez-Barrón L. J. Lípidos. en *Bases de la alimentación humana* (eds. Rodríguez Rivera, V. M. & Simón Magro, E.) 197-209 (Netbiblo, 2008).
- Rodríguez-Rodríguez M. F., Salas J. J., Venegas-Calderón M., Garcés R., & Martínez-Force E. Molecular cloning and characterization of the genes encoding a microsomal oleate δ 12 desaturase (CsFAD2) and linoleate δ 15 desaturase (CsFAD3) from *Camelina sativa*. *Ind. Crops Prod.* 89, 405-415 (2016).
- Rustan A. C. & Drevon C. A. Fatty acids: structures and properties. *Encycl. Life Sci.* 1-7 (2005) doi:10.1038/npg.els.0003894.
- Saha S., Enugutti B., Rajakumari S., & Rajasekharan R. Cytosolic triacylglycerol biosynthetic pathway in oilseeds. Molecular cloning and expression of peanut cytosolic diacylglycerol acyltransferase. *Plant Physiol.* 141, 1533-1543 (2006).
- Salanoubat M., Lemcke K., Rieger M., Ansorge W., Unseld M., Fartmann B., Valle G., Tabata S., et al. Sequence and analysis of chromosome 3 of the plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408, 820-822 (2000).
- Salas, J.J., Martínez-Force, E., & Garcés, R. Accumulation of phospholipids and glycolipids in seed kernels of different sunflower mutants (*Helianthus annuus*). *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, 83, 539-545 (2006).
- Salas J. J., Bootello M. A., & Garcés R. Food uses of sunflower oils. en *Sunflower: chemistry, production, processing, and utilization* (eds. Martínez-Force, E., Dunford, N. T. & Salas, J. J.) 441-464 (AOCS Press, 2015).
- Sambrook J., Fritsch E. F., & Maniatis T. *Molecular cloning. A laboratory manual.* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989).
- Sánchez-García A., Moreno-Pérez A. J., Muro-Pastor A. M., Salas J. J., Garcés R., & Martínez-Force E. Acyl-ACP thioesterases from castor (*Ricinus communis* L.): an enzymatic system appropriate for high rates of oil synthesis and accumulation. *Phytochemistry* 71, 860-869 (2010).
- Sandager L., Gustavsson M. H., Ståhl U., Dahlqvist A., Wiberg E., Banas A., Lenman M., Ronne H., & Stymne S. Storage lipid synthesis is non-essential in yeast. *J. Biol. Chem.* 277, 6478-6482 (2002).

- Sasaki Y. & Nagano Y. Plant acetyl-CoA carboxylase: structure, biosynthesis, regulation, and gene manipulation for plant breeding. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 68, 1175-1184 (2004).
- Sayanova O., Smith M. A., Lapinskas P., Stobart A. K., Dobson G., Christie W. W., Shewry P. R., & Napier J. A. Expression of a borage desaturase cDNA containing an N-terminal cytochrome b5 domain results in the accumulation of high levels of Δ^6 -desaturated fatty acids in transgenic tobacco. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 4211-4216 (1997).
- Schmid K. M., Andrews J., & Ohlrogge J. B. Fatty acid and lipid biosynthesis and degradation. en *Plant metabolism* (eds. Dennis, D. T., Turpin, D. H., Lefebure, D. D. & Layzell, D. B.) 414-429 (Longman, 1997).
- Schmid M., Davison T. S., Henz S. R., Pape U. J., Demar M., Vingron M., Schölkopf B., Weigel D., & Lohmann J. U. A gene expression map of *Arabidopsis thaliana* development. *Nat. Genet.* 37, 501-506 (2005).
- Scrimgeour C. M. & Harwood J. L. Fatty acid and lipid structure. en *The lipid handbook* (eds. Gunstone, F. D., Harwood, J. L. & Dijkstra, A. J.) 1-36 (CRC Press, 2007).
- Shamsi I. H., Shamsi B. H., & Jiang L. Biochemistry of fatty acids. en *Technological innovations in major world oil crops* (ed. Gupta, S. K.) 123-150 (Springer, 2012).
- Shindou H., Eto M., Morimoto R., & Shimizu T. Identification of membrane O-acyltransferase family motifs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 383, 320-325 (2009).
- Shindou H., Hishikawa D., Nakanishi H., Harayama T., Ishii S., Taguchi R., & Shimizu T. A single enzyme catalyzes both platelet-activating factor production and membrane biogenesis of inflammatory cells: cloning and characterization of acetyl-CoA:lyso-PAF acetyltransferase. *J. Biol. Chem.* 282, 6532-6539 (2007).
- Shockey J. M., Gidda S. K., Chapital D. C., Kuan J.-C., Dhanoa P. K., Bland J. M., Rothstein S. J., Mullen R. T., & Dyer J. M. Tung tree DGAT1 and DGAT2 have nonredundant functions in triacylglycerol biosynthesis and are localized to different subdomains of the endoplasmic reticulum. *Plant Cell* 18, 2294-2313 (2006).
- Sigal Y. J., McDermott M. I., & Morris A. J. Integral membrane lipid phosphatases/phosphotransferases: common structure and diverse functions. *Biochem. J.* 387, 281-293 (2005).
- Slabas A. R., Hanley Z., Schierer T., Rice D., Turnbull A., Rafferty J., Simon B., & Brown A. Acyltransferases and their role in the biosynthesis of lipids - opportunities for new oils. *J. Plant Physiol.* 158, 505-513 (2001).
- Slack C. R., Campbell L. C., Browse J. A., & Roughan P. G. Some evidence for the reversibility of the cholinephosphotransferase-catalysed reaction in developing linseed cotyledons in vivo. *Biochim. Biophys. Acta* 754, 10-20 (1983).
- Smith P. K., Krohn R. I., Hermanson G. T., Mallia A. K., Gartner F. H., Provenzano M. D., Fujimoto E. K., Goeke N. M., Olson B. J., & Klenk D. C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150, 76-85 (1985).
- Smith S., Witkowski A., & Joshi A. K. Structural and functional organization of the animal fatty acid synthase. *Prog. Lipid Res.* 42, 289-317 (2003).
- Snyder C. L., Yurchenko O. P., Siloto R. M. P., Chen X., Liu Q., Mietkiewska E., & Weselake R. J. Acyltransferase action in the modification of seed oil biosynthesis. *N. Biotechnol.* 26, 11-16 (2009).

- Sperling P., Linscheid M., Stöcker S., Mühlbach H.-P., & Heinz E. In vivo desaturation of cis- Δ^9 -monounsaturated to cis- $\Delta^9,12$ - diunsaturated alkenylether glycerolipids. *J. Biol. Chem.* 268, 26935-26940 (1993).
- Ståhl U., Banas A., & Stymne S. Plant microsomal phospholipid acyl hydrolases have selectivities for uncommon fatty acids. *Plant Physiol.* 107, 953-962 (1995).
- Ståhl U., Carlsson A. S., Lenman M., Dahlqvist A., Huang B., Banaś W., Banaś A., & Stymne S. Cloning and functional characterization of a phospholipid:diacylglycerol acyltransferase from *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 135, 1324-1335 (2004).
- Ståhl U., Ståhlberg K., Stymne S., & Ronne H. A family of eukaryotic lysophospholipid acyltransferases with broad specificity. *FEBS Lett.* 582, 305-309 (2008).
- Ståhlberg K., Neal A. C., Ronne H., & Ståhl U. Identification of a novel GPCAT activity and a new pathway for phosphatidylcholine biosynthesis in *S. cerevisiae*. *J. Lipid Res.* 49, 1794-1806 (2008).
- Ståhlberg K., Ståhl U., Stymne S., & Ohlrogge J. Characterization of two *Arabidopsis thaliana* acyltransferases with preference for lysophosphatidylethanolamine. *BMC Plant Biol.* 9, 1-8 (2009).
- Stobart A. K. & Stymne S. The interconversion of diacylglycerol and phosphatidylcholine during triacylglycerol production in microsomal preparations of developing cotyledons of safflower (*Carthamus tinctorius* L.). *Biochem. J.* 232, 217-221 (1985).
- Stobart K., Mancha M., Lenman M., Dahlqvist A., & Stymne S. Triacylglycerols are synthesised and utilized by transacylation reactions in microsomal preparations of developing safflower (*Carthamus tinctorius* L.) seeds. *Planta* 203, 58-66 (1997).
- Stukey J. E., McDonough V. M., & Martin C. E. Isolation and characterization of OLE1, a gene affecting fatty acid desaturation from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 264, 16537-16544 (1989).
- Stymne S. & Stobart A. K. Evidence for the reversibility of the acyl-CoA:lysophosphatidylcholine acyltransferase in microsomal preparations from developing safflower (*Carthamus tinctorius* L.) cotyledons and rat liver. *Biochem. J.* 223, 305-314 (1984).
- Stymne S. & Appelqvist L. The biosynthesis of linoleate from oleoyl-CoA via oleoyl-phosphatidylcholine in microsomes of developing safflower seeds. *Eur. J. Biochem.* 90, 223-229 (1978).
- Stymne S. & Glad G. Acyl exchange between oleoyl-CoA and phosphatidylcholine in microsomes of developing soya bean cotyledons and its role in fatty acid desaturation. *Lipids* 16, 298-305 (1981).
- Stymne S., Stobart A. K., & Glad G. The role of the acyl-CoA pool in the synthesis of polyunsaturated 18-carbon fatty acids and triacylglycerol production in the microsomes of developing safflower seeds. *Biochim. Biophys. Acta* 752, 198-208 (1983).
- Tafesse F. G., Ternes P., & Holthuis J. C. M. The multigenic sphingomyelin synthase family. *J. Biol. Chem.* 281, 29421-29425 (2006).
- Tamaki H., Shimada A., Ito Y., Ohya M., Takase J., Miyashita M., Miyagawa H., Nozaki H., Nakayama R., & Kumagai H. LPT1 encodes a membrane-bound O-acyltransferase involved in the acylation of lysophospholipids in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 282, 34288-34298 (2007).

- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipiński A., & Kumar S. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30, 2725-2729 (2013).
- Testerink C. & Munnik T. Phosphatidic acid: a multifunctional stress signaling lipid in plants. *Trends Plant Sci.* 10, 368-375 (2005).
- Testerink C. & Munnik T. Molecular, cellular, and physiological responses to phosphatidic acid formation in plants. *J. Exp. Bot.* 62, 2349-2361 (2011).
- Testet E., Bessoule J.-J., Mongrand S., Guillot-Salomon T., Cantrel C., & Cassagne C. Occurrence of an acyl-CoA:1-acylglycerophosphorylcholine acyltransferase in plant mitochondria. *FEBS Lett.* 399, 87-91 (1996).
- Thelen J. J. & Ohlrogge J. B. Metabolic engineering of fatty acid biosynthesis in plants. *Metab. Eng.* 4, 12-21 (2002).
- Theologis A., Ecker J. R., Palm C. J., Federspiel N. A., Kaul S., White O., Alonso J., Davis R. W., et al. Sequence and analysis of chromosome 1 of the plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408, 816-820 (2000).
- Tjellström H., Yang Z., Allen D. K., & Ohlrogge J. B. Rapid kinetic labeling of *Arabidopsis* cell suspension cultures: implications for models of lipid export from plastids. *Plant Physiol.* 158, 601-611 (2012).
- van De Loo F. J., Broun P., Turner S., & Somerville C. An oleate 12-hydroxylase from *Ricinus communis* L. is a fatty acyl desaturase homolog. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 6743-6747 (1995).
- van Meer G., Voelker D. R., & Feigenson G. W. Membrane lipids: where they are how they behave. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 112-124 (2008).
- Vance J. E. & Steenbergen R. Metabolism and functions of phosphatidylserine. *Prog. Lipid Res.* 44, 207-234 (2005).
- Velasco L., Pérez-Vich B., & Fernández-Martínez J. M. Novel variation for the tocopherol profile in a sunflower created by mutagenesis and recombination. *Plant Breed.* 123, 490-492 (2004).
- Velasco L. & Ruiz-Méndez M. V. Sunflower oil minor constituents. en *Sunflower: chemistry, production, processing, and utilization* (eds. Martínez-Force, E., Dunford, N. T. & Salas, J. J.) 297-330 (AOCS Press, 2015).
- Venegas-Calderón M., Troncoso-Ponce M. A., & Martínez-Force E. Sunflower oil and lipids biosynthesis. en *Sunflower: chemistry, production, processing, and utilization* (eds. Martínez-Force, E., Dunford, N. T. & Salas, J. J.) 259-296 (AOCS Press, 2015).
- Vincze T., Posfai J., & Roberts R. J. NEBcutter: a program to cleave DNA with restriction enzymes. *Nucleic Acids Res.* 31, 3688-3691 (2003).
- Vogel G. & Browse J. Cholinephosphotransferase and diacylglycerol acyltransferase: substrate specificities at a key branch point in seed lipid metabolism. *Plant Physiol.* 110, 923-931 (1996).
- von Heijne G. Membrane protein structure prediction: hydrophobicity analysis and the positive-inside rule. *J. Mol. Biol.* 225, 487-494 (1992).
- Vrânceanu A V. A. León, y Lopez L. Eds. *El girasol*. (Mundi-Prensa, 1977, Madrid).

- Wakil S. J., Stoops J. K., & Joshi V. C. Fatty acid synthesis and its regulation. *Annu. Rev. Biochem.* 52, 537-579 (1983).
- Wallis J. G. & Browse J. Mutants of *Arabidopsis* reveal many roles for membrane lipids. *Prog. Lipid Res.* 41, 254-278 (2002).
- Wang L., Shen W., Kazachkov M., Chen G., Chen Q., Carlsson A. S., Stymne S., Weselake R. J., & Zou J. Metabolic interactions between the Lands cycle and the Kennedy pathway of glycerolipid synthesis in *Arabidopsis* developing seeds. *Plant Cell* 24, 4652-4669 (2012).
- Weselake R. J., Taylor D. C., Rahman M. H., Shah S., Laroche A., McVetty P. B. E., & Harwood J. L. Increasing the flow of carbon into seed oil. *Biotechnol. Adv.* 27, 866-878 (2009).
- West R. W., Yocum R. R., & Ptashne M. *Saccharomyces cerevisiae* GAL1-GAL10 divergent promoter region: location and function of the upstream activating sequence UASG. *Mol. Cell. Biol.* 4, 2467-2478 (1984).
- White S. W., Zheng J., Zhang Y.-M., & Rock C. O. The structural biology of type II fatty acid biosynthesis. *Annu. Rev. Biochem.* 74, 791-831 (2005).
- Wickramaratna A. D., Siloto R. M. P., Mietkiewska E., Singer S. D., Pan X., & Weselake R. J. Heterologous expression of flax phospholipid:diacylglycerol cholinephosphotransferase (PDCT) increases polyunsaturated fatty acid content in yeast and *Arabidopsis* seeds. *BMC Biotechnol.* 15, 1-15 (2015).
- Xu J., Carlsson A. S., Francis T., Zhang M., Hoffman T., Giblin M. E., & Taylor D. C. Triacylglycerol synthesis by PDAT1 in the absence of DGAT1 activity is dependent on reacylation of LPC by LPCAT2. *BMC Plant Biol.* 12, 1-22 (2012).
- Yamaoka Y., Yu Y., Mizoi J., Fujiki Y., Saito K., Nishijima M., Lee Y., & Nishida I. Phosphatidylserine synthase1 is required for microspore development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 67, 648-661 (2011).
- Yanisch-Perron C., Vieira J., & Messing J. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33, 103-119 (1985).
- Yu B., Wakao S., Fan J., & Benning C. Loss of plastidic lysophosphatidic acid acyltransferase causes embryo-lethality in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* 45, 503-510 (2004).
- Yuan L., Mao X., Zhao K., Ji X., Ji C., Xue J., & Li R. Characterisation of phospholipid: diacylglycerol acyltransferases (PDATs) from *Camelina sativa* and their roles in stress responses. *Biol. Open* 6, 1024-1034 (2017).
- Yurchenko O. P., Nykiforuk C. L., Moloney M. M., Ståhl U., Banaś A., Stymne S., & Weselake R. J. A 10-kDa acyl-CoA-binding protein (ACBP) from *brassica napus* enhances acyl exchange between acyl-CoA and phosphatidylcholine. *Plant Biotechnol. J.* 7, 602-610 (2009).
- Yurchenko O., Singer S. D., Nykiforuk C. L., Gidda S., Mullen R. T., Moloney M. M., & Weselake R. J. Production of a *Brassica napus* low-molecular mass acyl-coenzyme A-binding protein in *arabidopsis* alters the acyl-coenzyme A pool and acyl composition of oil in seeds. *Plant Physiol.* 165, 550-560 (2014).
- Zhang D., Jasieniecka-Gazarkiewicz K., Wan X., Luo L., Zhang Y., Banas A., Jiang M., & Gong Y. Molecular characterization of two lysophospholipid:acyl-CoA acyltransferases belonging to the MBOAT family in *Nicotiana benthamiana*. *PLoS One* 10, 1-17 (2015).

Zhang M., Fan J., Taylor D. C., & Ohlrogge J. B. DGAT1 and PDAT1 acyltransferases have overlapping functions in Arabidopsis triacylglycerol biosynthesis and are essential for normal pollen and seed development. *Plant Cell* 21, 3885-3901 (2009).

Zhang X., Henriques R., Lin S.-S., Niu Q.-W., & Chua N.-H. Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana using the floral dip method. *Nat. Protoc.* 1, 1-6 (2006).

Zhao Y., Chen Y.-Q., Bonacci T. M., Brecht D. S., Li S., Bensch W. R., Moller D. E., Kowala M., Konrad R. J., & Cao G. Identification and characterization of a major liver lysophosphatidylcholine acyltransferase. *J. Biol. Chem.* 283, 8258-8265 (2008).

Zheng Q., Li J. Q., Kazachkov M., Liu K., & Zou J. Identification of Brassica napus lysophosphatidylcholine acyltransferase genes through yeast functional screening. *Phytochemistry* 75, 21-31 (2012).

Zhou X. R., Singh S., & Green A. Increased accumulation of epoxy fatty acids in Arabidopsis by transgenic expression of TAG assembly genes from *Bernardia pulchella*. 18th International symposium on plant lipids (2008).

Zou J., Wei Y., Jako C., Kumar A., Selvaraj G., & Taylor D. C. The Arabidopsis thaliana TAG1 mutant has a mutation in a diacylglycerol acyltransferase gene. *Plant J.* 19, 645-653 (1999).

Bevan M. Binary Agrobacterium vectors for plant transformation. *Nucleic Acids Res.* 12, 8711-8721 (1984).

VII. ANEXOS

7. ANEXOS

Anexo 1. Oligonucleótidos.

Gen o Plásmido	Nombre	Secuencia (5'-3')	Función	Diana
<i>HaLPCAT1</i>	<i>Bam</i> HI <i>HaLPCAT1</i> F <i>Xho</i> I <i>HaLPCAT1</i> R	TGGATCCATGGATATGGAATCAACG GC GCCTCGAGTCACTGTTCTTTTCGGGC TT	Clonación en pMBL-T, pYES2 y p423 <i>GPD</i>	<i>Bam</i> HI <i>Xho</i> I
	q <i>HaLPCAT1</i> F q <i>HaLPCAT1</i> R	GCCTCCATGAGACACTAACAT GAAGAACACATGAAAACGACAGC	qPCR	- -
	pBIN <i>HaLPCAT1</i> F pBIN <i>HaLPCAT1</i> R	TTGGATCCATGGATATGGAATCAAC GGC GGCTGCAGTCACTGTTCTTTTCGGG CTT	Clonación en pBIN19::35S	<i>Bam</i> HI <i>Pst</i> I
<i>HaLPCAT2</i>	<i>Bam</i> HI <i>HaLPCAT2</i> F <i>Xho</i> I <i>HaLPCAT2</i> R	TGGATCCATGGAAATGGAATCAATG G CGCTCGAGTCACTGCTCTTTCCGGG CTT	Clonación en pMBL-T, pYES2 y p423 <i>GPD</i>	<i>Bam</i> HI <i>Xho</i> I
	q <i>HaLPCAT2</i> F q <i>HaLPCAT2</i> R	CCTACACGAAACTGGCTG TAAACCTCACTGCTCTTTCCG	qPCR	- -
	pBIN <i>HaLPCAT2</i> F pBIN <i>HaLPCAT2</i> R	AAGGATCCATGGCGTCGGCGATC AACTGCAGTCACTGCTCTTTCCGG G	Clonación en pBIN19::35S	<i>Bam</i> HI <i>Pst</i> I
<i>HaLPCAT3</i>	<i>Eco</i> RI <i>HaLPCAT3</i> F <i>Xho</i> I <i>HaLPCAT3</i> R	GCGGCGAATTCATGAAAATGGAAGA AATGGC GCGCTCGAGTACTTTACTTTTCGGG CTC	Clonación en pJET1.2, pYES2 y p423 <i>GPD</i>	<i>Eco</i> RI <i>Xho</i> I
	q <i>HaLPCAT3</i> F q <i>HaLPCAT3</i> R	AAAGCCGCACACATCCAGAG CCTGTGGTGGTTCTTGAGAG	qPCR	- -
	pBIN <i>HaLPCAT3</i> F pBIN <i>HaLPCAT3</i> R	TTCCCGGGATGAAAATGGAAGAAAT GGC GGGTGACTTACTTTACTTTTCGGGC TCTGG	Clonación en pBIN19::35S	<i>Xma</i> I <i>Sal</i> I
<i>AtLPCAT1</i>	SALK_123480LP ⁽¹⁾ (2)	ACTCGGTTACAGAACCAGTG	lpcat1 lpcat2-2 ⁽¹⁾ (2)	- - -
	SALK_123480RP ⁽¹⁾ (2)	AAGCGCGGAAACTTACTTAC		
	SALK_LBb1	GCGTGGACCGCTTGCTGCAACT		
	JW160 ⁽¹⁾ JW217 ⁽¹⁾	GCGGCCGCATGGATATGAGTTCAAT G GGCGCGCCTTATTCTTCTTTACGCG GTTT	lpcat1 lpcat2.2 ⁽²⁾	<i>Not</i> I <i>Asc</i> I
RTlpcat1_2for RTlpcat1_2rev	GCAGGCTCACGGTTATTTA TTCTTTACGCGGTTTGGTC	Detección de la expresión del extremo 3'	- -	
<i>AtLPCAT2</i>	JW162 ⁽¹⁾ JW218 ⁽¹⁾	GCGGCCGCATGGAATTGCTTGACAT G GGCGCGCCTTATTCTTCTTTCTGGT CTT	lpcat1 lpcat2-2 ⁽¹⁾	<i>Not</i> I <i>Xho</i> I
	SAIL_1213_G01LP ⁽¹⁾ SAIL_1213_G01RP ⁽¹⁾	CGTTTTTCTTTCTGGCATCTG ATTTTACATGTCCGCACTGC	lpcat1 lpcat2-2 ⁽¹⁾	- - -
	SAIL_LB1	GCCTTTTCAGAAATGGATAAATAGC CTTGCTTCC		
	SAIL_357_H01LP ⁽²⁾ SAIL_357_H01RP ⁽²⁾ SAIL_LB2	TTTGGTTACCAATACATGGCG GAAGGCGACTAGTGTTCGTG GCTTCTATTATATCTTCCCAAATTA CCAATACA	lpcat1 lpcat2.2 ⁽²⁾	- - -
	RTlpcat2_2for RTlpcat2_2rev	GCTGTCTGGCATGGACTGTA GCGACTAGTGTTCGTGCAA	Detección de la expresión del extremo 3'	- -

<i>HaPDCT</i>	<i>HaPDCTF</i> <i>HaPDCTR</i>	TCACAATGAACGCCGATAAG ATAAGTGAGGTAGGTTTGTATACAA GA	Clonación de fragmento interno	- -
	<i>HaPDCTF2</i> <i>HaPDCTF3</i>	AAAATACATGAAGAAGGCTA TACAAACCTACCTCACTTAT	RACE 3'	- -
	<i>HaPDCTR2</i> <i>HaPDCTR3</i>	TGTTTTGAGGAGGGTGGTTG CTTATCGGCGTTCATTGTGA	RACE 5'	- -
	<i>HaPDCTF4</i> <i>HaPDCTR4</i>	ATGGGGACAATCACAATGAACGCC GGGTAAAGATAAGTGAGGTAGG	Clonación en pMBL-T y pYES2	- -
	<i>qHaPDCTF</i> <i>qHaPDCTR</i>	CTACACCATTGACTTAGCCGT TGACGTTGAAGTGGTTAAGGG	qPCR	- -
18S	18SF 18SR	GGTAGGCGATTGGCTAACATTGTCTG C GAGACACCAACAGTCTTTCCTCTGCG	Control	- -
Actina	<i>qHaACTF</i> <i>qHaACTR</i>	GCTAACAGGGAAAAGATGACTC ACTGGCATAAAGAGAAAAGCAGC	Control	-
pMBL-T y pSpark® II	M13F M13R	GTAAAACGACGGCCAGT AGGAAACAGCTATGACCATG	PCR de colonias y secuenciación	- -
pJET1.2	pJET1.2F pJET1.2R	CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG	PCR colonias y secuenciación	- -
pYES2	GAL1F CYCR	GTCAAGGAGAAAAAACCCTGGATC GCGTGACATAACTAATTACATGATG CG	PCR colonias y secuenciación	- -
p423 <i>GPD</i> y p416 <i>GPD</i>	GPDF CYC2R	AAGTATATAAAGACGGTAGG ATAGGGACCTAGACTTCAGG	PCR colonias y secuenciación	- -
pBIN19::35S	pBIN19F pBIN19R	GAAAGGGGGATGTGCTGCAAGG CACACAGGAAACAGCTATGACC	PCR colonias y secuenciación	- -
-	FA2Z	AACTGGAAGAATTCGCGG	RACE 3'	-
- - -	UPM1 UPM2	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAG CAGTGGTAACAACGCAGAGTCTAAT ACGACTCACTATAGGGC	RACE 5'	- - -
-	NUP	AAGCAGTGG TATCAACGC AGAGT	RACE 5'	-

⁽¹⁾ Wang et al., 2012 ⁽²⁾ Xu et al., 2012

Anexo 2. Genotipos de cepas de microorganismos.

Genotipos de *E. coli*

<i>endA1</i>	Mutación en la endonucleasa I (digestión no específica). Esta mutación mejora la calidad de los plásmidos aislados.
<i>F'</i>	Plásmido auto trasmisivo y de baja copia usado para generación de DNA monocatenario cuando se infecta con el fago M13; tiene las siguientes características <i>proAB lacI^qZAM15 Tn10</i> .
<i>gyrA96</i>	Mutación en la DNA girasa. Esta mutación produce resistencia al ácido nalidíxico.
<i>hsdSMR</i>	Mutaciones en endonucleasas de <i>E. coli</i> , evitando la restricción y metilación de ADN exógeno.
<i>lacI^q</i>	Sobreexpresión del represor lac. El IPTG, se une al represor lac y lo desplaza del promotor, induciendo la expresión génica.
<i>lac</i>	Supresión del operón lac. El operón lac permite la transcripción del gen que codifica la enzima β -D-galactosidasa.
<i>lacI^qZAM15</i>	Gen del plásmido <i>F'</i> . Confiere a la cepa del péptido de una β -galactosidasa mutante derivada de la cepa M15 de <i>E. coli</i> , que no es funcional. La actividad β -galactosidasa se complementa con la secuencia (<i>lacZα</i>), que llevan los plásmidos utilizados en el proceso de transformación, que codifica los primeros residuos de la enzima (α -péptido). Permite así la selección de colonias recombinantes mediante X-Gal (Cribado azul/blanco).
<i>mcrA, mcrCB o mrr</i>	Mutaciones en endonucleasas de restricción de metilcitosinas (<i>mcrA, mcrCB</i>) o metiladeninas (<i>mrr</i>), permiten la clonación de ADN metilado o genómico.
<i>proAB</i>	Mutaciones en genes implicados en la ruta de biosíntesis de prolina. Impide el crecimiento celular en medio sin prolina.
<i>RecA1</i>	<i>RecA1</i> es una forma inactiva de <i>RecA</i> , que es utilizada para reparar y mantener el ADN. La mutación en el gen <i>RecA</i> reduce la recombinación homóloga de ADN y ayuda a garantizar la estabilidad del inserto.
<i>relA1</i>	Fenotipo relajado. Este fenotipo hace la membrana de la bacteria más frágil y también permite la síntesis de ARN en ausencia de síntesis de proteínas.
<i>supE44</i>	Incluye un supresor para las mutaciones ámbar (mutaciones que convierten cualquier codón en codón de terminación ámbar, UAG). La supresión se lleva a cabo por inserción de glutamina.
<i>thi-1</i>	Mutación en la ruta de biosíntesis de tiamina, que impide el crecimiento celular en medio mínimo sin tiamina.

Tn10 (Tet^r) Inserción de un transposón que confiere resistencia a tetraciclina.

Genotipos de *A. tumefaciens*

rpoH⁺ El gen *rpoH* codifica para el gen homólogo de *E. coli* sigma 32 (σ^{32}), que regula la transcripción de las principales proteínas de choque térmico citoplasmático.

hrcA⁺ *HrcA* es un represor de la transcripción inducible por temperatura. Regulador negativo de genes de choque térmico de clase I (operones *grpE-dnaK-dnaJ* and *groELS*).

Genotipos de las cepas de *S. cerevisiae*

BIO Genes posiblemente implicados en la biosíntesis de biotina.

CPT1 1,2-diacilglicerol colinafosfotransferasa que cataliza la síntesis de PC a partir de DAG y CDP-colina.

cpt1::LEU2 Interrupción del gen *CPT1* por integración de *LEU2*

EPT1 1,2-diacilglicerol colina/etanolaminafosfotransferasa, que cataliza la síntesis de PC/PE a partir de DAG y CDP-colina/CDP-etanolamina.

ept1-1 Mutación del gen *EPT1*

FLO Proteínas implicadas en la floculación.

GAL2 Permeasa de galactosa.

HAP1 Factor de transcripción de respuesta a hemo y oxígeno.

HIS3 Gen de síntesis de histidina.

his3Δ1 o *his3-1* Deleción o mutación del gen *HIS3*, respectivamente. Hace que se requiera histidina para el crecimiento, permitiendo la selección de vectores que portan este gen.

HO Endonucleasa específica de sitio para conversión del locus MAT.

kanMX4 Módulo de resistencia a la kanamicina.

LEU2 Gen *LEU2* que codifica la β -Isopropilmalato deshidrogenasa implicada en la síntesis de leucina.

<i>leu2Δ0</i> o <i>leu2-3,112</i>	Delección o mutación del gen <i>LEU2</i> , respectivamente. Hace que se requiera leucina para el crecimiento, permitiendo la selección de vectores que portan este gen.
<i>MAL2</i>	Complejo multigénico, para la fermentación de maltosa.
<i>MATα</i>	Tipo sexual haploide de <i>S. cerevisiae</i> .
<i>MEL</i>	Alfa-galactosidasa secretada.
<i>MET15</i>	Gen de síntesis de metionina.
<i>met15Δ0</i>	Delección del gen <i>MET15</i> .
pGREG546Gal:: <i>slc1</i>	La cepa contiene el plásmido pGREG546 con el gen <i>SLC1</i> , cuya expresión está controlada por el promotor <i>GAL1</i> inducible por galactosa.
<i>SLC1</i>	Gen lisofosfatidato aciltransferasa.
<i>slc1Δ::kanMX4</i>	Reemplazo del gen <i>SLC1</i> por <i>KanMX4</i> .
<i>SUC2</i>	Invertasa, enzima de hidrólisis de sacarosa.
<i>TRP1</i>	Gen que codifica la anthranilato isomerasa implicada en la síntesis de triptófano.
<i>trp1-289</i>	Mutación del gen <i>TRP1</i> .
<i>URA3</i>	Gen de síntesis de uracilo que codifica la orotidina-5'-fosfato descarboxilasa implicada en la síntesis de pirimidina.
<i>ura3Δ0</i> o <i>ura3-52</i>	Delección o mutación del gen <i>URA3</i> . Hace que se requiera uracilo para el crecimiento, permitiendo la selección de vectores que portan este gen.
<i>YOR175c</i> (<i>LCA1</i> , <i>SCL4</i> , <i>LPT1</i> o <i>ALE1</i>)	Gen lisofosfatidilcolina aciltransferasa.
<i>YOR175c::KanMX4</i>	Interrupción del gen <i>YOR175c</i> por integración de <i>KanMX4</i> .
<i>yor175c::LEU2</i>	Interrupción del gen <i>YOR175c</i> por integración de <i>LEU2</i> .

Anexo 3. Secuencias nucleotídicas y aminoácidas de enzimas clonadas en este trabajo.

Secuencias nucleotídica y aminoácida de *HaLPCAT1*

1	ATGGATATGG	AATCAACGGC	GGCGGCGATC	GGAGTATCCG	TACCGGTGCT	CCGGTTCCTC
61	CTATGCTTCA	TCGCCACTAT	TCCGACCGGA	TTCTTCCACC	GGTTCGTTCC	CGGCGGCGCC
121	ACCGGAAAAC	ACCTCTACGC	TGCTGTCACC	GGAGTTGTGT	TGTCGTACTT	ATCGTTCGGT
181	TTCTCGTCGA	ATCTGCACTT	TCTGGTGCCG	ATGCTCGTCG	GTTATGTGTC	AATGGTGGTG
241	TATCGGAAGC	GGTGTGGAGT	GATTACGTTT	GTGTTAGCTT	TTGGATACCT	TATTGGATGC
301	CATGTGTACT	ACATGAGTGG	AGATGCATGG	AAGGAAGGGG	GTATTGATGC	TACTGGAGCT
361	CTTATGGTGT	TAACATTGAA	AGTGATTTCA	TGCGCCATTA	ATTACAATGA	TGGGCTACTA
421	AAAGAGGAAG	ATCTCCGTGA	TCCCAAAAAG	AAAAACCGGT	TGCTTAAGCT	ACCTTCTTTA
481	ATAGAGTACA	TGGGATATTG	TCTCTGTTGT	GCAAGTCACT	TTGCAGGCC	GGTTTACGAA
541	ATGAAGGATT	ACTTAGATTG	GACAGAAGGG	AAGGGGATAT	GGAGCAAGTC	CGAGAAAGGT
601	TCGCCGTCAC	CATTCAGGGC	AACCATTAGA	GCTCTTGTTT	AAGCGGGTTT	TTGTATGGGT
661	TTATACTTAT	ATTTGGTACC	CCATTATCCA	CTATCGAAAT	TCACTGACCC	GGTATACAAA
721	GAGTGGGGAT	TCTGGAAACG	ACTTAGCTAC	CAGTACATGG	CGGGCCCTAC	GGCCCGTTGG
781	AAGTATTATT	TTATATGGTC	CATATCGGAA	GCTGCATTA	TTATTTCTGG	CTTGGGCTTT
841	AGTGGATGGA	CTGATTCTTC	TCCACCCAAG	GCCCGATGGG	ACCACGCCAA	AAATGTTGAT
901	ATATTGGGTC	TTGAGTTTGC	TAGGAGCGCT	GTAGAGATAC	CGCTCGTGTG	GAATATACAA
961	GTCAGCACGT	GGCTTCGTCA	TTATGTTTAC	GACAGACTTG	TTCCAAAGGG	GAAGAAGGCT
1021	GGTTTCTTCC	AGTTGCTTGC	AACACAAACC	GTTAGTGCTG	TTTGGCATGG	GTTGTATCCG
1081	GGGTACATCA	TATCTTTCGT	TCAATCAGCT	TTGATGATTG	CTGGTTCAAG	AGCCATTTAC
1141	AGATGGCAAC	AATCCGTTCC	GCCAAATTTG	GGGTTGCTTA	AGAAGTTATT	TATGCTTGTG
1201	AACTTTGCTT	ATACAGTTCT	CGTTTTGAGC	TACTCCTGCG	TCGGTTTCAT	GGTATTAAGC
1261	CTCCATGAGA	CACTAACATC	ATACGGGAGT	GTATACTACA	TTGGAACAT	TATTCCTGTC
1321	GTACTIONTCC	TTCTTGTTAA	CGTTATCAAA	ACAAAGCCAG	CTAGATCGAA	AGCCCCAAAA
1381	GAACAGTGA					

1	MDMESTAAAI	GVSVPVLRFL	LCFIATIPTG	FFHREFVPGA	TGKHLAAVT	GVVLSYLSFG
61	FSSNLHFLVP	MLVGYVSMVV	YRKRRCGVITF	VLAFGYLIGC	HVYYMSGDAW	KEGGIDATGA
121	LMVLTLLKVIS	CAINYNDGLL	KEEDLRDSQK	KNRLLKLPSL	IEYMGYCLCC	ASHFAGPVYE
181	MKDYLDWTEG	KGIWSKSEKQ	SPSPFRATIR	ALVQAGFCMG	LYLYLVPHYP	LSKFTDPVYK
241	EWGFWKRLSY	QYMAGLTARW	KYYFIWSISE	AAIIISGLGF	SGWTDSSPPK	ARWDHAKNVD
301	ILGLEFARSA	VEIPLVWNIQ	VSTWLRHYVY	DRLVPGKKA	GFFQLLATQT	VSVAWHGLYP
361	GYIIFVQSA	LMIAGSRAIY	RWQQSVPPNL	GLLKKLFMLV	NFAYTVLVLS	YSCVGFVMLS
421	LHETLTSYGS	VYYIGTIIPV	VLILLGNVIK	TKPARSKARK	EQ	

Secuencias nucleotídica y aminoácida de *HaLPCAT2*

1	ATGGAAAATGG	AATCAATGGC	GTCGGCGATC	GGAGTATCAG	TTCCGGTACT	CCGCTTCCTC
61	CTCTGTTTCG	TCGCCACCAT	CCCCGTCAGC	TTCTTCCACC	GCCTCGTCCC	CGGCGGCGCC
121	ACCGCCCGCC	ACCTCTACGC	CGCCGTTACC	GGCGCTCTGC	TCTCCTACAT	TTCATTTGGG
181	TTCTCTTCGA	ACCTGCACTT	CTTCGTGCCC	ATGTTGATTA	GTTATGGATC	AATGGTTGTG
241	GCCAGGAAAT	GGTGTGGTGT	GATTTCTGTT	TTGTCGGCTA	TGGGGTACCT	CATTGGATGC
301	CATGTATACT	ACATGAGCGG	AGATGCATGG	AAGGAAGGCG	GAATTGATGC	TACAGGATCT
361	CTTATGGTGA	TAACATTGAA	AGTGATTTCA	TGTGCCATTA	ATTACAACGA	TGGATTATTA
421	AAAGAAGCAG	ATCTTCGTGA	ATCCCAAAAAG	AAAAACCGCA	TACTTAAGTT	GCCATCTTTA
481	ATCGAGTATG	TGGGATATTG	CTTATGCTGC	GGAAGTCACT	TCGCTGGTCC	GGTTTACGAA
541	ATCAAAGATT	ATTTGGATTG	GACCGAAAGA	AAGGGGATTT	GGACAAAGTC	CGAGAAAGGC
601	ACACCATCAC	CATTTTTGCC	AACACTACGA	GCGATTCTCC	AAGCGGGTTT	CTGTATGGGT
661	TTGTATTTAT	ATCTATCGCC	TTCGTATCCG	CTTTCAAGAT	TCAGTGAGCC	GATATATCAA

721 GAATGGGGAT TTGTGAAACG TCTGACCGTC CAATACATGT CGGGCTTCAC CGCGCGTTGG
 781 AAATATTATT TCATTTGGTC TATCTCAGAA GCTTCTATCA TTATTTTCGGG CTTCGGTTTC
 841 AGTGGCTGGA CTGACTCTTC TCCACCCAAA GCCCGATGGG ACCGTGCGAA AAACGTTGAC
 901 GTTTTGGGTG TTGAGTTTGC AAAGAGTTCG GTTGAGTTAC CACTCGTGTG GAATATCCAA
 961 GTCAGCACAT GGCTTCGTCA CTATGTTTAT GACAGACTTG TTCAAAAGGG AAAGAAGCCT
 1021 GGCTTTTTTCC AATTGTTAGC AACACAGACT GTTAGCGCTG TCTGGCATGG ATTATATCCT
 1081 GGGTACTTGA TATCTTTTGT TCAATCTGCT TTGATGATTG CCGGGTCAAG AGCCATTTAC
 1141 AGATGGCAGC AGGCGGTTCC GCCAACCGTT AAGAAGTTTT TGATGCTCAT GAACTTTGCT
 1201 TACACGCTTC TTGTTCTTAA CTACTCCTGC ATAGTTTTTA TGGTATTAAG CCTACACGAA
 1261 AACTGGCTG CATA CGGAAG TGTATACTAC GTTGGAAACCA TCATTTCCAGT GGC GTTGATC
 1321 CTCTCGGGA ACATAATCAA GCCAAAATCG GCCCGATCCA AAGCCCGGAA AGAGCAGTGA

1 MEMESMASAI GVSVPVLRFL LCFVATIPVS FFHRLVPGGA TARHLYAAVT GALLSYISFG
 61 FSSNLHFFVP MLISYGSMV ARKWCGLISF LSAMGYLIGC HVYYMSGDAW KEGGIDATGS
 121 LMVITLKVIS CAINYNDGLL KEADLRESQK KNRIKLPSL IEYVGYCLCC GSHFAGPVYE
 181 IKDYLDWTER KGIWTKSEK TSPFPLPTLR AILQAGFCMG LYLYLSPSYP LSRFSEPIYQ
 241 EWGFVKRLTV QYMSGFTARW KYFIFWVSE ASIIISGFGF SGWTDSSPPK ARWDRAKNVD
 301 VLGVEFAKSS VELPLVWNIQ VSTWLRHYVY DRLVQKGGKP GFFQLLATQT VSAVWHGLYP
 361 GYLIFVQSA LMIAGSRAIY RWQAVPPTV KKFLMLMNFAY TLLVLNYSY IGFVLSLHE
 421 TLAAYGSVYY VGTIIPVALI LLGNIKPKS ARSKARKEQ

Secuencias nucleotídica y aminoacídica de *HaLPCAT3*

1 ATGAAAATGG AAGAAAATGGC GTCTATGATC GGGGTATCAC GCCCTGTATT CCAATTCCTT
 61 TTATGTTTCG TGGCCACAAT TCCTGTCAGC CTCTTCCATC GCTTCGTCCC TGGCGGTCCC
 121 ACCGCAAAGC ACCTCTATGC TGCAACCACC GGTGCCGGCC TCTCCTACCT GGCCTTTGGC
 181 CTCTCTTCCA ATTTACACTT CCTCGTGCTT ATCGTCATCA GCTACGGCTC TATGACCCTC
 241 TGTCGGAAAC GATGTGGCCT CATTACTTTC TTCTTAGCAA TGGGTTATCT CATCGCATGC
 301 CATGTGTAAT ACATGAGTGG GGATTTATGG AAGGAAGGAG GTATTGATGC TACTGGATCC
 361 ATGATGGTGA TAACACTCAA AGTGATTTTCG TGCGCTTTTA ATTATAACGA TGGCTCCTTA
 421 AAAGAGAGAC GTCTACGCGA TACCCAAAAG AAAAAATCGAT TGTTTAGGTT ACCCTCTGTC
 481 ATAGAGTATG TGGCATATTG TCTCTGCTGT GGAACACTCT TTGCAGGCC CGTTTATGAA
 541 ATGAAGGATT ATTTAGATTG GACACAAGGG AAGGGGATTT GGACCAGGTC TGAGAAACCT
 601 TCACCATCAC CTATTGGGCC AACAGTTAAA GCTATCCTTC AAGCTGGTTT GTGTATGGGT
 661 GTCTACTTAT ACCTTGATCC CCGATATCCA TTAGAAAGAA TTGGGGACCC GGTTTATAAA
 721 AGTTGGGGAT TTATTGATAG GTTTAGCTAC CAGTACATGT GTAGCTTTTC TGCGCGCTGG
 781 AAATATTATT TCATATGGTC GGTCTCAGAA GCTTCCATGA TTCTTTTCGGG CCTTGGTTTC
 841 AGCGGATGGA CCAATTCTGT TCCAATTGAA GCACAATGGA GAGGGGCCAA AAATGTTGAT
 901 ATTTTGGGTG TTGAATTTGC AAAGAGTGCA GTAGAGATAC CACTTGTGTG GAATATACAC
 961 GTCAGCACAT GGCTTAGACA TTATGTTTAT GACAGGCTTG TTCAAAAGGG GAAAAGACCT
 1021 GGTTTTTTTCC AGTTGCTGGC AACACAGACT GTCAGTGTG TATGGCATGG TTTATATCCA
 1081 GGGTACATTA TATCTTTTGT TCAATCTGCT TTGATGATTT CTGGTTCAA AGCCATTTAC
 1141 AGATGGCACC AATCTGTCTC GGGCGGTAAA CGTATGTTTA AGAAGATGAT TATGCTCTCA
 1201 AATTTTCGCTT ACACAGTTAT TGTCTAACC TACTCTTCTG TTGGTTTCAT GGTACTAAGT
 1261 CTGGACGAAA CAATCACTGC ATACGAGAGT GTATTCTACA TTGGAACCAT TCTTCTGTG
 1321 GTTTTTCATCC TCTTTGGTAG CATTATGATC AAATCAAAGC CGCACACATC CAGAGCCCGA
 1381 AAAGTAAAGT AA

1 MKMEEMASMI GVSVPVLRFL LCFVATIPVS LFHFRVPGGP TAKHLYAATT GAGLSYLAFG
 61 LSSNLHFLVL IVISYGSMTL CRKRCGLITF FLAMGYLIAC HVYYMSGDLW KEGGIDATGS
 121 MMVITLKVIS CAFNYNDGSL KERRLRDQK KNRLFRLPSV IEYVAYCLCC GTHFAGPVYE
 181 MKDYLDWTQ KGIWTRSEK SPSPIGPTVK AILQAGLCMG VYLYLDPYR LERIGDPVYK
 241 SWGFIDRFSY QYMCSFSARW KYFIFWVSE ASMILSGLGF SGWTNSVPIE AQWRGAKNVD
 301 ILGVEFAKSA VEIPLVWNIH VSTWLRHYVY DRLVQKGGKP GFFQLLATQT VSAVWHGLYP
 361 GYLIFVQSA LMISGSKAIY RWHQSVSGGK RMFKKMIMLS NFAYTVIVLT YSSVGFVLSL
 421 LDETITAYES VFYIGTILPV VFILFSGIMI KSKPHTSRAR KVK

Secuencias nucleotídica y aminoacídica de *HaROD1*/*HaPDCT*

1 ATGGGGACAA TCACAATGAA CGCCGATAAG ATCCACCAAC GTTCCATACC ACAAAACAACC
 61 ACCCTCCTCA AAACATCAAA CAACGTTTCC ATTAACAATT TCAATCTCAA AAAGACCAAC
 121 AATTCTACGA CCACATGGGG ATCGCTAGCG GACGCGTCGT TTTTACAATG GACAACATCG
 181 GATGTGTTTCG GTTTGTTTAA GTACCACCCC GTCCCGTGTT TCTTTGCTGT TTCGTTACTG
 241 TTTTTTATGG GTGTGGAGTA TACGCTGCGG ATGATACCGC CCTCGTCACC CCCGTTGAT
 301 ATTGGGTTTCG TTGCCACTGC GTATTTGCAT CGTGCCTCG TCGCTAGTCC GACGCTAAAC
 361 ACAGTTCTCG CAGGGCTTAA TACGGTGTTT GTGGGGATGC AAACAACCTA TATAATAGGG
 421 ACGTGGGTCA TTGAAGGGCG GCCGAGAGCC ACAGTCGCGG CGCTGTTTCA GTTTACTTGC
 481 AGAGGGATT TGGGTTATTC GACACAGCTT CCTTGCCTG AGGGATTCTT GGGTTCGGGA
 541 GCAGACTTTC CGGTAGGCAA TGTGTCCTTC TTCTTGTTTT ATTCTGGTCA TGTAGCAGGA
 601 TCAGTAATTG CATCGTTTGA TATGAAGAGA ATGCATAGGT GGGAGTTGGC CTTTCTATTC
 661 GACACCTTGA ACCTTTTGCA GGTGGTGC GG TACTAAGCA CAAGGGGACA CTACACCATT
 721 GACTTAGCCG TCGGAGTAGG TGCCGGCATG TTGTTTGATT CCCTCGCCGG AAAATACATG
 781 AAGAAGGCTA TGGCTGAAGG AGGTGATGTC TTGTATACAA ACCTACCTCA CTTATCTTAA

1 MGTITMNADK IHQRSIPQTT TLLKTSNNVS INNFNLKKTN NSTTTWGLA DASFLQWTS
 61 DVFGLFKYHP VPCFFAVSLL FFMGVEYTLR MIPPSSPPFD IGFVATAYLH RVLVASPTLN
 121 TVLAGLNTVF VGMQTTYIIG TWVIEGRPRA TVAALFMFTC RGILGYSTQL PLPEGFLGSG
 181 ADFPVGNVSF FLFYSGHVAG SVIASFDMKR MHRWELAF LF DTLNLLQVVR LLSTRGHYTI
 241 DLA VGVGAGM LFDSL AGKYM KKAMAEGGDV LYTNLPHLS